

ANDRÉ SCHENKEL DEDECEK

**ANÁLISE DA ILHA GENÔMICA *hrp/hrc* DE *Herbaspirillum seropedicae* E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS GENES *hrcC*, *hrcV* e *hrpG***

Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau
de Mestre em Bioquímica, Curso de
Pós-Graduação em Bioquímica,
Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leda Satie
Chubatsu

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Rose
Adele Monteiro

**CURITIBA
2006**

AGRADECIMENTOS

A minhas orientadoras Leda Satie Chubatsu e Rose Adele Monteiro pela orientação e apoio.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica, especialmente os que fazem parte do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio.

A Roseli Prado, Valter e Julieta.

Aos demais colegas de laboratório e Departamento, especialmente a LÍlian e a Luiza.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Aos meus familiares e amigos por todo o apoio e cooperação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA	1
1.2 ILHAS GENÔMICAS	3
1.3 SECREÇÃO DE PROTEÍNAS	6
1.4 SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III	9
1.5 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III EM FITOPATÓGENOS	14
1.6 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III EM MICRORGANISMOS SIMBIONTES	21
1.7 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	22
1.8 A ILHA DE GENÔMICA <i>hrp/hrc</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	23
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 BACTÉRIAS	26
3.1.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	26
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	26
3.2 PLASMÍDEOS	27
3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	28
3.3.1 Antibióticos	29
3.3.2 Estocagem das bactérias	29
3.4 MEIOS DE CULTURA	30
3.5 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA	33
3.5.1 Purificação de plasmídeos	33
3.5.2 Purificação de DNA genômico de <i>H. seropedicae</i>	34
3.5.3 Extração de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão	34
3.6 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DO DNA	35
3.6.1 Eletroforese de DNA	35
3.6.2 Digestão de DNA por enzimas de restrição	36
3.6.3 Preparo de plasmídeos para clonagem	36
3.6.4 Ligação de fragmentos de DNA nos vetores	36
3.6.5 Seqüenciamento de DNA	37
3.6.6 Amplificação de DNA	36
3.7 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	37
3.7.1 Transformação bacteriana por eletroporação	37
3.7.1.1 Preparo de células eletrocompetentes	37
3.7.1.2 Transformação bacteriana	38
3.7.2 Transferência de plasmídeos por conjugação bacteriana	38
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS	39
3.8.1 Atividade de β -Galactosidase	39

3.8.2 Dosagem de proteínas.....	40
3.9 OBTENÇÃO DO MUTANTE <i>hrcV</i> DE <i>H. seropedicae</i>	40
3.9.1 Construção do plasmídeo <i>phrcVTc</i>	40
3.10 CONSTRUÇÃO DO VETOR SUICIDA PARA A MUTAÇÃO DE <i>hrcC</i> ...	41
3.11 CONSTRUÇÃO DO VETOR SUICIDA PARA A FUSÃO CROMOSSOMAL DE <i>hrpG::lacZ</i>	42
3.12 HIBRIDIZAÇÃO DE DNA.....	43
3.12.1 Transferência do DNA do gel para a membrana de nylon.....	43
3.12.2 Marcação da sonda com [³² P].....	43
3.12.3 Hibridização DNA/DNA.....	44
3.13 ENSAIOS DE CAPACIDADE DE INVASÃO E COLONIZAÇÃO EM PLANTA.....	44
3.13.1 Descontaminação das sementes e germinação.....	45
3.13.2 Inoculação das plantas com <i>H. seropedicae</i>	45
3.13.3 Descontaminação externa das raízes e quantificação de bactérias.....	46
3.14 CONSTRUÇÃO DA FUSÃO <i>hrcC :: lacZ</i>	46
3.15 CONSTRUÇÃO DA FUSÃO <i>hrpG :: lacZ</i>	47
3.16 ENSAIO DE ATIVIDADE DA FUSÃO <i>hrcC :: lacZ</i> POR CONTATO PLANTA-BACTÉRIA.....	47
3.16.1 Ensaio da cultura.....	47
3.16.2 Ensaio das bactérias aderidas à raiz.....	48
3.17 PROGRAMAS DE BIOINFORMÁTICA.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 ANÁLISE DA ILHA GENÔMICA <i>hrp/hrc</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	50
4.1.1 Análise dos produtos dos genes presentes na ilha de patogenicidade de <i>H. seropedicae</i>	51
4.1.2 Análise comparativa da organização dos genes presentes no “cluster” <i>hrp</i> de <i>H. seropedicae</i> e outras bactérias.....	57
4.2 ANÁLISE DOS GENES <i>hrcV</i> , <i>hrcC</i> e <i>hrpG</i> de <i>H. seropedicae</i>	60
4.2.1 Análise parcial do gene <i>hrcV</i>	61
4.2.1.1 Obtenção do mutante <i>hrcV</i> DE <i>H. seropedicae</i>	61
4.2.2 Análise parcial do gene <i>hrcC</i>	65
4.2.2.1 Construção do plasmídeo <i>phrcCTc</i> para a obtenção de mutante.....	66
4.2.2.2 Análise da expressão da fusão <i>hrcC::lacZ</i>	68
4.2.3 Análise parcial do gene <i>hrpG</i>	74
4.2.3.1 Análise da expressão da fusão <i>hrpG::lacZ</i>	75
4.2.3.2 Construção do plasmídeo <i>phrpGlacZKm</i> para a obtenção da fusão cromossomal <i>hrpG::lacZ</i> e mutação do gene <i>hrpG</i>	78
5. CONCLUSÃO.....	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FATORES DE VIRULÊNCIA ENCONTRADOS EM ILHAS DE PATOGENICIDADE.....	4
TABELA 2 - PROTEÍNAS Hrc DE FITOPATÓGENOS E SEUS CORRESPONDENTES HOMÓLOGOS EM PATÓGENOS ANIMAIS E NO SISTEMA DE BIOSÍNTESE FLAGELAR.....	18
TABELA 3 - ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	26
TABELA 4: ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i>	26
TABELA 5: LISTA DE PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....	27
TABELA 6 – ANTIBIÓTICOS.....	29
TABELA 7 - SIMILARIDADE ENTRE OS PRODUTOS DOS GENES DO “CLUSTER” <i>hrp</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> E DE OUTRAS BACTÉRIAS.....	53
TABELA 8 - SIMILARIDADE ENTRE A PROTEÍNA HrpG DE <i>H. seropedicae</i> E AQUELAS ENCONTRADAS EM OUTROS ORGANISMOS.....	55
TABELA 9 - EFEITO DA FONTE DE CARBONO, CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO E FOSFATO NA EXPRESSÃO DA FUSÃO <i>hrcC::lacZ</i>	71
TABELA 10 - EXPRESSÃO DA FUSÃO <i>hrcC::lacZ</i> EM MEIO MÍNIMO M9.....	72
TABELA 11: ENSAIO DA EXPRESSÃO DA FUSÃO <i>hrpG::lacZ</i> EM MEIO NFbHP – MALATO COM 20 mmol/L DE NH ₄ Cl E CONCENTRAÇÃO NORMAL DA MISTURA DE FOSFATOS.....	76
TABELA 12: ENSAIO DA EXPRESSÃO DA FUSÃO <i>hrpG::lacZ</i> EM MEIO NFbHP – SUCCINATO COM 20 mmol/L DE NH ₄ Cl E UM DÉCIMO DA CONCENTRAÇÃO NORMAL DE FOSFATOS.....	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MODELO ESQUEMÁTICO DOS SISTEMAS DE SECREÇÃO DO TIPO I, II E III.....	7
FIGURA 2 - ARRANJO HIPOTÉTICO DAS PROTEÍNAS DO SISTEMA <i>hrp</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	24
FIGURA 3 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>hrc/hrp</i> DE <i>H. seropedicae</i>	50
FIGURA 4 A - COMPARAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. seropedicae</i> , <i>P. syringae</i> E <i>E. amylovora</i>	58
FIGURA 4 B - COMPARAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. seropedicae</i> , <i>R. solanacearum</i> E <i>X. campestris</i>	59
FIGURA 4 C - COMPARAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. seropedicae</i> , <i>Yersinia spp.</i> E <i>Rhizobium spp.</i>	60
FIGURA 5 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO <i>phrcVTc</i>	63
FIGURA 6 - ANÁLISE DO MUTANTE <i>hrcV</i> DE <i>H. seropedicae</i>	64
FIGURA 7 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO <i>phrcCTc</i>	67
FIGURA 8 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO <i>pphrcC</i>	69
FIGURA 9 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO <i>pphrpG</i>	75
FIGURA 10 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO <i>phrpGlacZKm</i>	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	- ATP-binding cassette
Amp	- Ampicilina
ATP	- 5'-trifosfato de adenosina
BSA	- Albumina de soro bovino
Cm	- Cloranfenicol
dATP	- 5'-trifosfato de 2'desoxiadenosina
dCTP	- 5'-trifosfato de 2'desoxicitosina
dGTP	- 5'-trifosfato de 2'desoxiguanosina
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
D. O.	- Densidade ótica
dTTP	- 5'-trifosfato de 2'desoxitimidina
EDTA	- Ácido etilenodiamino-tétra-acético
EPEC	- <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
kb	- Kilopares de bases nucleotídicas
Km	- Canamicina
mRNA	- RNA mensageiro
Nal	- Ácido nalidíxico
ONPG	- o-nitrofenil- β -D-galactosídeo
<i>orf</i>	- "Open reading frame"
PAIs	- Ilhas de patogenicidade
pb	- Pares de bases nucleotídicas
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
RNA	- Ácido ribonucleico
SDS	- Dodecilsulfato de sódio
Tc	- Tetraciclina
Tris	- Tris(hidroximetil)-aminometano
tRNA	- RNA transportador
UV	- Ultravioleta

RESUMO

O sistema de secreção do tipo III é encontrado em várias bactérias, fitopatógenos, patógenos humanos e microrganismos simbiotes. Os genes codificadores deste sistema são encontrados agrupados nas chamadas “ilhas de patogenicidade”. Dados obtidos pelo Programa de Sequenciamento Genômico de *Herbaspirillum seropedicae* (GENOPAR) indicaram a presença de genes homólogos àqueles que codificam para o sistema de secreção do tipo III, compreendendo uma região de aproximadamente 28 kb. Esta região foi analisada, sendo encontrados 14 genes denominados de *hrp/hrc*, devido a maior homologia com os genes do sistema de fitopatógenos, 2 genes denominados de *pil* e 15 *orfs* hipotéticas conservadas. O gene *hrpG*, que codifica para um provável sistema de dois componentes, foi identificado fora da ilha genômica. Devido a presença do gene *hrpL*, que codifica para um provável fator sigma, e do gene *hrpG*, acredita-se que a regulação desta ilha genômica em *H. seropedicae* seja um híbrido entre os grupos I e II. Neste trabalho foram parcialmente analisados os genes *hrcC*, *hrcV* e *hrpG*. O mutante ASD1 de *H. seropedicae* (*hrcV*) foi obtido pela inserção de um cassete contendo o gene de resistência a tetraciclina no gene *hrcV*. Este mutante está sendo utilizado para o estudo da interação milho-*H. seropedicae* a fim de verificar possível fenótipo. Fusões *hrcC::lacZ* e *hrpG::lacZ* foram obtidas e, análises preliminares variando-se a fonte de carbono e nitrogênio, concentração de fosfatos e o meio de cultivo indicaram que as condições de expressão dos genes *hrp/hrc* de *H. seropedicae* parecem ser diferentes das encontradas para outras bactérias.

ABSTRACT

The type III secretion system is found in many bacteria, plant pathogens, human pathogens and symbiotic microorganisms. This system encoding genes is found clustered in genomic regions known as “pathogenic islands”. Data from the Genomic Sequence Program of *Herbaspirillum seropedicae* (GENOPAR program) shown genes homologous to those coding for the type III secretion system. Those genes are present in a 28 kb region comprising 31 probable genes or *orfs*: 14 *orfs* are homologous to *hrc/hrp* genes, with higher similarity to genes present in plant pathogenic bacteria, 2 genes homologous to *pil* and 15 conserved hypothetical *orfs*. A *hrpG* like gene, which codes for a probable two-component transcriptional activation system, was found in another region in the *H. seropedicae* genome. Due to the presence of the *hrpL*-like gene, which codes for a probable sigma factor, and *hrpG*, is likely that the regulation of this genomic island is a hybrid between group I and II of the plant pathogens *hrp/hrc* secretion systems. In this work, the *hrcC*, *hrcV* and *hrpG* genes were partially analyzed. A *H. seropedicae* *hrcV* mutant, named ASD1, was obtained by insertion of tetracyclin resistance cassette into the *hrcV* gene. This mutant is being analyzed for interaction between maize and *H. seropedicae*. We also obtained *hrcC::lacZ* and *hrpG::lacZ* fusions and preliminary analysis changing carbon and nitrogen source, phosphate concentration and culture medium indicated that the *hrp/hrc* expression in *H. seropedicae* is different to those observed in other bacteria.

1. INTRODUÇÃO

1.1 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Nutrientes são essenciais para a sobrevivência de todos organismos vivos. Por definição, todos os heterótrofos devem procurar nutrientes em outros organismos para saciar essa necessidade fundamental. Como produtoras primárias, as plantas são a maior fonte de carbono e energia para a maioria de organismos, de micróbios a humanos (BRENCIC & WINANS, 2005).

Praticamente todas as plantas vivem em íntima associação com microrganismos, que podem colonizar sua superfície (colonização epifítica) ou ocupar espaços em tecidos internos (colonização endofítica) (BRENCIC & WINANS, 2005).

O processo de interação planta-bactéria pode ser dividido em três classes: simbiótica, fitopatogênica e associativa. A interação simbiótica, exemplificada pela interação *Bradyrhizobium*-soja (PÜHLER, et al., 2004), caracteriza-se pelo favorecimento mútuo entre as duas partes. Nesse caso, o resultado é que o microsimbionte é capaz de fixar o nitrogênio atmosférico, que pode ser utilizado pelo macrosimbionte, em troca de proteção e nutrientes (PÜHLER, et al., 2004). Para a interação fitopatogênica, os microrganismos desenvolveram métodos específicos de ataque às células do hospedeiro em que utilizam substâncias produzidas pela planta, em seu benefício e, neste caso, a diversidade de interações é maior. Nas interações associativas, há um aproveitamento maior por parte do microrganismo. A bactéria pode viver no exudato, ou mesmo no interior da planta e, como recompensa por exemplo, protege a planta suprimindo patógenos ou estimulando o crescimento da planta através de produção de substâncias específicas (PÜHLER et al., 2004).

Qualquer que seja o tipo de interação bactéria-planta, o crescimento competitivo e a sobrevivência do microorganismo em diversas partes do hospedeiro necessitam de respostas adaptativas por parte da bactéria. Estas e outras pressões seletivas parecem ter direcionado a evolução de sistemas especializados de regulação que controlam a expressão de fatores de virulência (MILLER, MEKALANOS & FALKOW, 1989).

As bactérias fitopatogênicas utilizam uma gama de estratégias para a invasão e a colonização do hospedeiro (ALEGRIA et al, 2004). Estudos bioquímicos, genéticos e celulares destes fitopatógenos demonstraram que os mecanismos utilizados envolvem fatores como adesinas, pili, fatores de sinalização bacteriana, fatores de transcrição especializados como os fatores sigma alternativos, receptores de fatores externos ou derivados de plantas, proteínas envolvidas em transdução de sinais, e proteínas que constituem ou regulam sistemas de secreção de macromoléculas e fatores de patogenicidade (ALDON et al., 2000; BRITO et al., 2002; FRANCIS, WOLF-WATZ & FORSBERG, 2002, HUECK, 1998; SLATER et al., 2000). Este processo normalmente acarreta modificações, ou mesmo o comprometimento da homeostase do tecido invadido ou até da planta inteira.

Na interação associativa o evento chave parece ser a colonização da rizosfera (PÜLER et al, 2004). Dentre os estágios deste processo estão a percepção da planta, a quimiotaxia em direção a raiz e a aderência e colonização da superfície da raiz. *Pseudomonas fluorescens* exibe quimiotaxia em resposta a exudatos de plantas que são considerados dirigentes da interação planta-microorganismo (DE WEERT et al., 2002).

O processo de interação bactéria-planta, embora bastante complexo e variável para cada organismo, parece envolver algumas etapas em comum. Aparentemente, muitas bactérias que interagem com hospedeiros eucarióticos possuem um tipo de sistema de secreção classificado como tipo III (HE, NOMURA & WHITTAM, 2004). Este sistema exporta uma série de fatores protéicos, diretamente no citoplasma da célula eucariótica, a fim de modular respostas celulares do hospedeiro e permitir a interação. Caracterizado primeiramente em bactérias patogênicas, o sistema de secreção do tipo III também foi encontrado em simbioses, como *Rhizobium* sp. NGR234, e em associativos como *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (VIPREY et al., 1998; PRESTON, BERTRAND & RAINEY, 2001). Dados obtidos no Programa de Sequenciamento Genômico da bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* indicaram a presença de genes homólogos ao sistema do tipo III, sugerindo que este sistema esteja presente nesta bactéria e que possa estar envolvido no processo de interação entre *Herbaspirillum seropedicae* e a planta associada.

1.2 ILHAS GENÔMICAS

Análises realizadas com diferentes microrganismos, cujo genoma foi seqüenciado, mostraram que eles apresentam uma seqüência principal (“core”) caracterizada por um conteúdo de C+G uniforme e uma freqüência de utilização de codons homogênea. Essa seqüência principal geralmente codifica para genes importantes/essenciais para a sobrevivência do microrganismo (HACKER & KAPER, 2000; HECKER et al.,1997).

Por outro lado, existem regiões do genoma que eventualmente foram adquiridas por transferência horizontal (lateral) e, portanto, podem apresentar um conteúdo C+G e uma preferência do uso de codons diferente da seqüência principal (HACKER & KAPER, 2000; HECKER et al.,1997). Essas regiões podem codificar para sistemas com funções acessórias que forneçam vantagens para o microrganismo. Essas funções podem ser exemplificadas como resistência a antibióticos e sistemas envolvidos na simbiose ou patogenicidade. Estas regiões foram denominadas de ilhas gênicas, podendo ser subdivididas em outras, dependendo da função dos genes que codifica. Desta forma foram denominadas as chamadas Ilhas Ecológicas, Ilhas de “fitness”, Ilhas de Patogenicidade e Ilhas de Simbiose (HACKER & KAPER, 2000; HECKER et al.,1997).

No caso de microrganismos patogênicos, a “ilha de patogenicidade” (PAIs) possui agrupados os genes necessários para a infecção e sua permanência no hospedeiro (HACKER & KAPER, 2000; HECKER et al.,1997).

As Ilhas de Patogenicidade podem possuir genes para um ou mais fatores de virulência (TABELA 1). Em algumas bactérias patogênicas estes fatores contribuem para o potencial patogênico, enquanto que em bactérias não-patogênicas os mesmos fatores podem ser importantes na sobrevivência e replicação em nichos ecológicos específicos (HACKER & KAPER, 2000).

TABELA 1: FATORES DE VIRULÊNCIA ENCONTRADOS EM ILHAS DE PATOGENICIDADE.

Fator de Virulência	Exemplos de Microrganismos
Fatores de aderência	<i>Escherichia coli</i> diarreiogenica <i>E. coli</i> uropatogênicas <i>Vibrio cholerae</i> <i>Listeria</i> spp.
Toxinas	<i>E. coli</i> uropatogênica <i>Staphylococcus aureus</i>
Sistemas de captação de ferro	<i>E. coli</i> uropatogênica <i>Shigella flexneri</i> <i>Yersinia</i> spp.
Invasão, modulinas, efetores	<i>E. coli</i> diarreiogenica <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp. <i>Listeria</i> spp.
Sistema de secreção do tipo III	<i>E. coli</i> diarreiogenica <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Erwinia</i> spp. <i>Yersinia</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp.
Sistema de secreção do tipo IV	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

FONTE: HACKER, J.; KAPER, J.. Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. Annu. Rev. Microbiol. 2000, 54: 641-679.

Sabe-se que fatores de patogenicidade podem ser codificados por elementos geneticamente móveis. Como exemplo temos os fatores codificados por fagos, as toxinas “Shiga-like” de *Escherichia coli*, a toxina colérica do *Vibrio cholerae*, a toxina diftérica do *Corynebacterium diphtheriae*, a neurotoxina do *Clostridium botulinum* e a citotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (HACKER & KAPER, 2000; CHEETHAM & KATZ, 1995). Ainda, codificados por um transposon, temos os genes ST-enterotoxinas de *E. coli* e diversos fatores de virulência importantes em microrganismos Gram-negativos e positivos codificados por plasmídeos. A transferência lateral de genes por plasmídeos ou fagos pode ter um papel importante no aparecimento de novas variantes patogênicas, podendo-se considerar estas estruturas como precursores de Ilhas de Patogenicidade ou pré-PAIs (WALDOR & MEKALANOS, 1996; HACKER & KAPER, 2000; HECKER et al., 1997).

As PAIs normalmente são flanqueadas por seqüências de repetição direta e 75% estão associadas com genes de RNA transportadores (tRNA). O locus do tRNA normalmente pode funcionar como sítio de integração para DNA externos. Além disso, as ilhas normalmente possuem genes que codificam para

fatores de mobilidade como integrases, transposases e elementos de inserção de sequência ou parte destes elementos. Outra característica comum é que estas regiões são consideradas instáveis (HACKER & KAPER, 2000; HOU, 1999). As seqüências de repetição direta são provavelmente geradas com a inserção dos elementos pré-PAI no genoma “core” do organismo hospedeiro. Estas repetições podem funcionar como um alvo no processo de excisão. Algumas PAIs tem a tendência de deleção, processo independente de RecA e com o envolvimento de integrases, principalmente as codificadas pela própria ilha (HACKER & KAPER, 2000; HECKER et al., 1997). Muitas das PAIs são instáveis e foi verificado em *E. coli* que essas são retiradas do genoma bacteriano com uma freqüência de 10^{-4} (HACKER et al., 1990). Sugere-se que essa instabilidade seja decorrente da presença dos genes de mobilidade. O pouco restante das ilhas é mais estável, provavelmente devido à inativação dos genes de mobilidade após serem integradas ao restante do genoma (HACKER & KAPER, 2000; HECKER et al., 1997). Normalmente o terminal 3' dos genes de tRNA são alvos de integração destes elementos. A análise de várias PAIs mostrou que há uma sobreposição de 15 a 25 nucleotídeos entre o final 3' do *loci* do tRNA e a seqüência específica da ilha. A principal hipótese é que a estrutura secundária conservada do tRNA forneça motivos estruturais que facilitam a integração e excisão das ilhas de patogenicidade (HACKER & KAPER, 2000; HECKER et al., 1997; HOU, 1999)

Freqüentemente, dentro das ilhas de patogenicidade são encontrados genes produtores de proteínas reguladoras dos genes responsáveis pelos fatores de virulência, entretanto alguns reguladores também podem ser encontrados fora da ilha. As duas maiores classes de proteínas que regulam os genes das PAIs são as proteínas ativadoras de transcrição, semelhantes a AraC, e as reguladoras de resposta de dois componentes. Há ainda os fatores sigma alternativos e as proteínas semelhantes a histonas (HACKER & KAPER, 2000).

1.3 SECREÇÃO DE PROTEÍNAS

Secreção protéica é definida como qualquer processo em que uma proteína atravesse a membrana externa da célula, incluindo saída de proteínas que permanecem ligadas à superfície da célula, ou que vão fazer parte de estruturas especiais montadas na superfície celular (THANASSI & HULTGREN, 2000; HUECK, 1999).

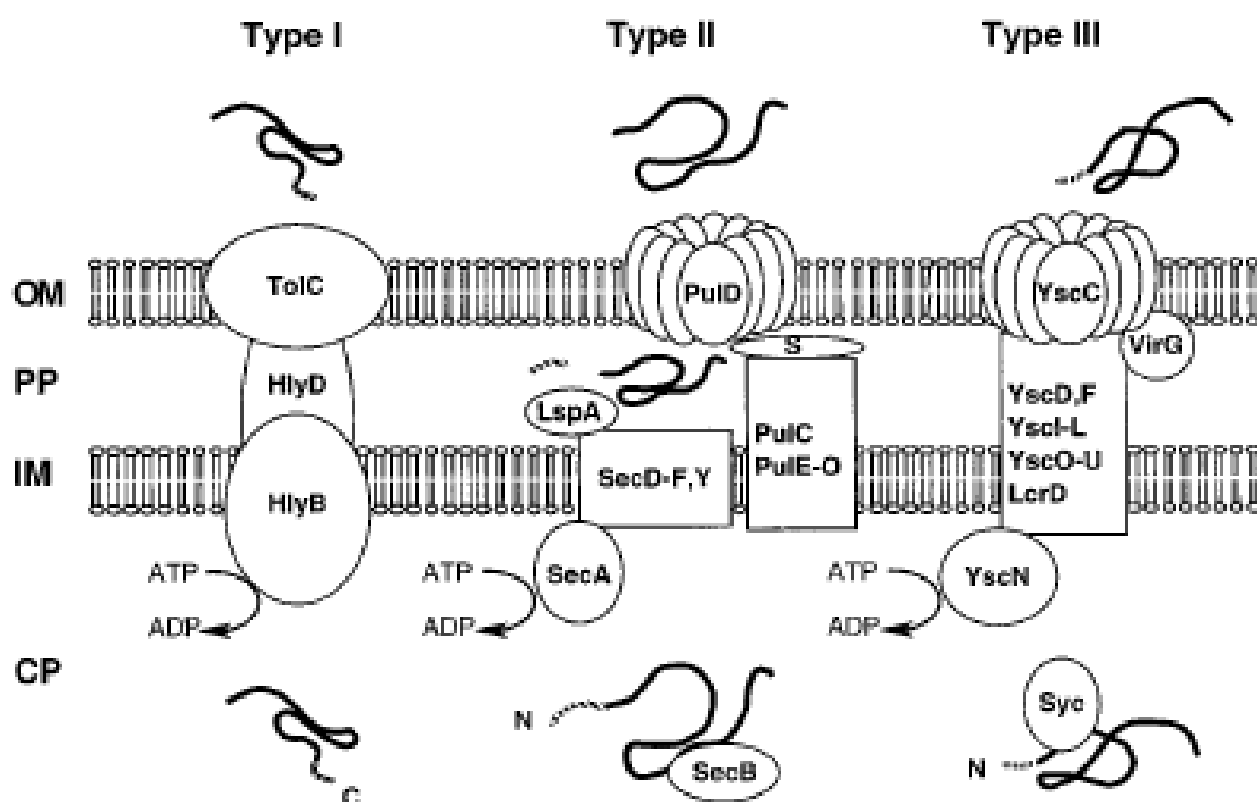
A secreção de proteínas é necessária em vários aspectos no ciclo de vida de uma bactéria, incluindo biogênese de flagelo, aquisição de nutrientes e expressão de fatores de virulência. Para isso as bactérias Gram-negativas enfrentam um desafio maior, pois as proteínas para serem secretadas necessitam atravessar o periplasma e a membrana externa, além do citoplasma e a membrana interna (THANASSI & HULTGREN, 2000; PUGSLEY, 1993).

Existem alguns fatores que devem ser superados para que uma proteína atravesse a membrana externa. Primeiro as proteínas adquirem sua conformação já no periplasma, incluindo a formação de pontes dissulfeto e adquirem sua conformação completa antes de atravessar a membrana externa. Considerando que a presença de ATP ou de outra fonte de energia seja praticamente inexistente na membrana externa, para que haja a secreção de proteínas os sistemas de transporte devem possuir um mecanismo especial para que seja gerado energia na porção externa do sistema ou possuir algum mecanismo que preserve e transfira a energia para a membrana interna (THANASSI & HULTGREN, 2000).

As bactérias Gram-negativas desenvolveram sistemas de secreção de proteínas que podem ser divididos em seis grupos (I a VI), porém somente os quatro primeiros são mais bem estudados. Quatro destes (II, IV, V e VI) fazem parte do sistema geral de secreção, onde as proteínas exportadas apresentam uma seqüência sinal amino-terminal dependente do sistema Sec para a passagem pela membrana interna (THANASSI & HULTGREN, 2000, SANDKIVST, 2001). Em *E. coli*, o sistema Sec envolve proteínas na membrana interna (SecD, SecE, SecF e SecY), uma ATPase citoplasmática associada à membrana (SecA), uma chaperona (SecB) que se liga à proteína que será secretada e uma peptidase periplasmática que cliva o peptídeo sinal

(THANASSI & HULTGREN, 2000; HUECK, 1998). Os outros mecanismos de passagem (I e III) são independentes de Sec e podem transportar as proteínas diretamente do citoplasma para o exterior da bactéria. Três destes, dentre eles o do tipo III, possuem um mecanismo de secreção semelhante a sistemas de biogênese de organelas e um dos mecanismos se dedica à montagem de estruturas de superfície (THANASSI & HULTGREN, 2000). Um esquema dos sistemas de secreção do tipo I, II e III está demonstrado na figura 1.

FIGURA 1: MODELO ESQUEMÁTICO DOS SISTEMAS DE SECREÇÃO DO TIPO I, II E III.



FONTE: HUECK, C. J. **Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants.** Microbiol. And Molecular Biol. Rev., New York, v. 62, p. 379-433, 1998.

O Sistema de Secreção do Tipo II é utilizado por várias bactérias Gram-negativas principalmente para a secreção de enzimas degradativas extracelulares, geralmente associadas à degradação de tecidos do hospedeiro. A secreção por este sistema é dividida em duas etapas: a primeira envolve a passagem pela membrana interna, que é feita pelo sistema Sec, ocorrendo a ligação do peptídeo sinal aminoterminal ao complexo de proteínas Sec

associadas à membrana interna e a passagem da proteína pela membrana (PUGSLEY, 1993; HENDERSON, NAVARRO-GARCIA & NATARO, 1998). Posteriormente, há a clivagem do peptídeo sinal e a liberação da proteína no periplasma, que então será secretada para o exterior da bactéria (PUGSLEY, 1993; SANDKVIST, 2001). O modelo mais estudado é o sistema de secreção de pulanase por *Klebsiella oxytoca*. Este sistema é complexo e necessita de 12 a 16 proteínas para sua formação. Pelo menos 7 destas proteínas estão localizadas na membrana citoplasmática e 2 (PulD e PulS) na membrana externa. O poro de membrana externa é formado por 12 subunidades de PulD que é cercado por outras 12 subunidades de PulS, formando uma estrutura polimérica que possui um diâmetro suficiente para a passagem de uma molécula com o tamanho de uma exoproteína como a pulanase (NOUWEN et al., 1999). Outros exemplos deste sistema são os de secreção de enzimas pécnicas e celulasas por *Erwinia* spp., de elastase, exotoxina A e fosfolipase C por *Pseudomonas aeruginosa*, de amilase e protease por *Aeromonas hydrophila* e de poligalactouronase por *Xanthomonas campestris* (THANASSI & HULTGREN, 2000; HUECK, 1998; PUGSLEY, 1993; SANDKVIST, 2001).

O sistema de Secreção do Tipo IV também necessita de duas etapas para a externalização das proteínas, semelhantemente ao Sistema do Tipo II (HUECK, 1998; PUGSLEY, 1993). Este sistema é similar aos sistemas IncP e IncN de conjugação bacteriana e ao sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens*, que faz a translocação do T-DNA oncogênico para as células de plantas. Este sistema pode ser encontrado em gonococos para a secreção de imunoglobulina A e outras proteases, em *Helicobacter pylori* para a secreção de uma citotoxina, em *Bordetella pertussis* para a secreção de toxina e em *Shigella flexneri* e EPEC (*E. coli* enteropatogênica) para a secreção de SepA e EspC, respectivamente (THANASSI & HULTGREN, 2000; HUECK, 1998; PUGSLEY, 1993).

No caso dos sistemas de secreção dos tipos I e III, que são independentes de Sec, a secreção de proteínas acontece de maneira contínua, sem a presença de intermediários periplasmáticos (HUECK, 1998).

O Sistema de Secreção do tipo I, “ATP-binding cassette” ou ABC é utilizado por várias bactérias Gram-negativas para a secreção de toxinas, proteases e lipases (THANASSI & HULTGREN, 2000; HUECK, 1998). O

principal exemplo é o sistema de secreção de α -hemolisina por *E. coli* (HUECK, 1998). Seguido dos sistemas de leucotoxina por *Pasteurella haemolytica* e de protease por *P. aeruginosa* e *Erwinia chrysanthemi*. Este sistema de secreção possui três componentes estruturais: uma ATPase localizada na membrana interna, que fornece energia para o sistema e é responsável pela passagem pela membrana interna; uma proteína de membrana externa, que forma o poro externo de passagem; e, finalmente, uma proteína de fusão de membrana, que é ancorada na membrana interna e faz ligação entre as proteínas da membrana interna e externa. Apesar do processo de secreção ser independente de Sec, a montagem do aparato secretor não é, pois a proteína externa é transportada através da membrana interna pelo sistema Sec. As proteínas secretadas por este sistema não possuem seqüência na extremidade aminoterminal clivável, mas elas possuem uma seqüência sinal carboxiterminal de aproximadamente 60 aminoácidos, que não é submetida à clivagem proteolítica. O sinal parece estar relacionado com a conformação secundária da região carboxiterminal. Este sinal de secreção parece ser específico para as subfamílias do sistema de secreção do tipo I (THANASSI & HULTGREN, 2000; HUECK, 1998; PUGSLEY, 1993).

1.4 SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III

O Sistema de Secreção do Tipo III é encontrado em bactérias Gram-negativas, incluindo patógenos animais, fitopatógenos ou microrganismos simbiotes e associativos (HUECK, 1998; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000; PÜHLER et al., 2004) e permite a exportação de proteínas bacterianas para o interior da célula eucariótica. No interior dessas células, as proteínas bacterianas, também chamadas de efetores, modificam sinais celulares em benefício da bactéria. Como exemplo de bactérias onde esse sistema foi encontrado, temos os patógenos animais *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* enteropatogênica e enterohemorrágica (EPEC e EHEC, respectivamente), *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis* e *Burkholderia pseudomallei*; os fitopatógenos *Erwinia* spp., *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas* spp.; bactérias simbiotes *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium*

japonicum e *Sinorhizobium fredii*; e os microrganismos associativos como *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (PÜHLER et al., 2004; HUECK, 1998; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000; ALAGRIA et al., 2004). Em *Herbaspirillum seropedicae*, um diazotrofo endofítico (BALDANI et al., 1986), genes similares a esse sistema foram identificados durante o Programa de Sequenciamento Genômico da bactéria (GENOPAR).

O Sistema de Secreção do Tipo III é formado por aproximadamente 20 proteínas, sendo que a maioria está localizada na membrana interna da bactéria (HUECK, 1998). Também fazem parte do sistema uma proteína formadora do poro na membrana externa e uma ATPase citoplasmática, provavelmente ancorada à membrana (HUECK, 1998; THANASSI & HULTGREN, 2000). Essas proteínas associam-se numa estrutura supramolecular que lembra uma seringa com uma agulha (ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999; BÜTTNER & BONAS, 2002; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000), sendo que o corpo da seringa está presente na membrana interna e a agulha atravessa a membrana externa, fazendo o contato com a célula hospedeira (ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999; BÜTTNER & BONAS, 2002; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000).

A maioria das proteínas presentes na membrana interna apresenta alta homologia aos componentes do aparelho de biossíntese de flagelo tanto de bactérias Gram-negativas quanto de Gram-positivas (HUECK, 1998). Já a proteína de membrana externa é homóloga a PulD, a proteína responsável pela formação do poro de membrana externa no sistema de secreção tipo II (HUECK, 1998).

Apesar do Sistema de Secreção do Tipo III não possuir um intermediário periplasmático, o transporte pela membrana externa e interna é separado (HUECK, 1998; CHARKOWISKI *et al.*, 1997), o que foi constatado utilizando-se um mutante da proteína homóloga de PulD em *P. syringae* que acumulava a proteína secretada no periplasma (HUECK, 1998; CHARKOWISKI *et al.*, 1997).

Além destes componentes ainda estão presentes lipoproteínas menos conservadas e uma estrutura denominada de “complexo da agulha”. Este complexo foi inicialmente visualizado nos patógenos animal *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli* (HUECK, 1998; THANASSI & HULTGREN, 2000; GALAN & COLLMER, 1999). Posteriormente, o “complexo

da agulha” foi identificado em fitopatógenos e recebeu o nome de “pili Hrp” (HUECK, 1998; THANASSI & HULTGREN, 2000; GALAN & COLLMER, 1999; LI *et al.*, 2002; BÜTTNER & BONAS, 2002).

O “pili Hrp” atravessa ambas as membranas, interna e externa. A subunidade formadora do pili é uma pequena proteína em α -hélice, não conservada entre patógenos animais e fitopatógenos (EBEL *et al.*, 1998; DELAHAY *et al.*, 1999). Esse “hrp pili” é formado por subunidades secretadas via Sistema Tipo III e montado na superfície da bactéria decorrente de contato com as células do organismo hospedeiro (LI *et al.*, 2002). Sugere-se que este pili, filamento ou agulha forme um canal entre a bactéria e as células eucarióticas, porém não existem evidências diretas que confirmem sua existência. Sabe-se atualmente que há a formação de um contato físico entre a bactéria e o hospedeiro e que ocorre a penetração da parede celular da célula eucariótica (HUECK, 1998; THANASSI & HULTGREN, 2000; GALAN & COLLMER, 1999; LI *et al.*, 2002).

Em *Pseudomonas syringae*, duas proteínas foram isoladas e caracterizadas como formadoras do “pili Hrp”. Uma delas, identificada como HrpA, é uma proteína hidrofílica de 11 kDa, secretada sem processamento amino terminal e é necessária para a patogenicidade desta bactéria (HUECK, 1998; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000). Uma proteína similar a HrpA está presente no grupamento *hrp* de *Erwinia amylovora* (HUECK, 1998; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000). O “pili Hrp” também pode ser encontrado em *Ralstonia solanacearum* e seu monômero formador foi denominado de HrpY (HUECK, 1998; LI *et al.*, 2002; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000).

A agulha presente em patógenos animais possui um diâmetro maior que o “pili Hrp” de fitopatógenos, porém o último é consideravelmente maior em comprimento, podendo se estender por alguns micrômetros (BÜTTNER & BONAS, 2002; LI *et al.*, 2002).

O Sistema de Secreção do Tipo III exporta proteínas bacterianas efetoras para a célula hospedeira, a qual acaba por ter seu metabolismo modificado. Embora similaridade seja encontrada nas proteínas estruturais para o sistema, as proteínas secretadas dependem de cada bactéria, não havendo um consenso evidente. As proteínas secretadas por esse sistema variam muito de tamanho, estrutura e função (HUECK, 1998; GALAN &

COLLMER, 1999; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999). Em muitos casos, os genes que as codificam localizam-se fora do “cluster” que codifica o sistema de secreção, porém geralmente ambos parecem ser co-regulados (HUECK, 1998; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1997; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999). As proteínas secretadas já identificadas não possuem peptídeo sinal na porção amino-terminal e, análises de mutações de algumas destas, mostraram um alto grau de tolerância para as alterações da porção amino-terminal, sem que haja a interrupção de sua secreção (ANDERSON & SCHNEEWIND, 1997). Com isso propôs-se que a sinalização para a secreção reside na extremidade 5’ do mRNA que codifica as proteínas secretadas (ANDERSON & SCHNEEWIND, 1997; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999). Uma vez que a repressão da tradução das proteínas secretadas seria devido a propriedades do mRNA da proteína, que forma uma estrutura dobrada que impede o reconhecimento dos sinais de início de tradução. Este impedimento parece ser rompido após a interação mRNA com o maquinário de secreção, expondo assim o sítio de ligação para o ribossomo, indicando então que a tradução destas proteínas seja acoplada a sua secreção. Este processo é semelhante ao que acontece em eucariotos, com acoplamento da tradução e translocação de proteínas para o interior do retículo endoplasmático (HUECK, 1998; GALAN & COLLMER, 1999; THANASSI & HULTGREN, 2000; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999).

As proteínas que são secretadas necessitam de pequenas proteínas, normalmente ácidas, citoplasmáticas, com função de chaperonas, que se ligam individualmente às proteínas secretadas para a sua proteção contra interações prematuras com outros componentes do sistema (HUECK, 1998; PARSOT, HAMIAUX & PAGE, 2003). Ainda servem como um sinal alternativo para a secreção, pois se ligam durante a tradução e se separam para a secreção. Estas, possuem uma especificidade de ligação relativamente baixa e não apresentam atividade de ligação ou hidrólise de nucleotídeos. As chaperonas do sistema de secreção do tipo III possuem várias funções, dependendo do substrato. Essas funções também são variáveis, dependendo da atividade de secreção. Algumas proteínas contendo sítio de ligação de chaperonas somente são secretadas na presença das chaperonas. Em alguns dos casos foi constatado que as chaperonas são necessárias para a secreção de proteínas efetoras armazenadas enquanto o sistema de secreção não está funcionando.

Porém, a partir do momento que o sistema entra em funcionamento, as proteínas efetoras produzidas não precisam mais da presença das chaperonas para ser secretadas. Normalmente as chaperonas são codificadas por genes localizados próximos ao gene que codifica para a proteína com que elas interagem (HUECK, 1998; GALAN & COLLMER, 1999; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999; PARSOT, HAMIAUX & PAGE, 2003).

Sugere-se que os sinais existentes em proteínas efetoras para a secreção pelo Sistema do Tipo III, a presença de sinal no mRNA e a necessidade de chaperonas para a secreção, também são conservados entre os vários microrganismos portadores deste sistema. COLLMER e colaboradores (1998) clonaram os genes codificadores para as proteínas do sistema de secreção de *Erwinia caratovora* em um cosmídio e o inseriram em *E. coli*. Esta linhagem recombinante foi utilizada para a expressão das proteínas efetoras AvrPto e AvrB de *Pseudomonas syringae*. Ambas as proteínas foram encontradas no meio de cultura, indicando que houve reconhecimento dos sinais necessários para a secreção (HAM et al., 1998; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999).

A expressão das proteínas do sistema de secreção e a secreção em si das proteínas efetoras parecem ser estimuladas pelo contato entre a bactéria e seu hospedeiro (HUECK, 1998). Embora possa se conseguir a expressão destes genes e a secreção das proteínas *in vitro*, cada microrganismo necessita de condições diferentes para que isso ocorra.

Yersinia spp. e *Pseudomonas aeruginosa* dependem de condições limitantes de íons cálcio (Ca^{2+}) e uma temperatura de cultivo de 26 a 37°C, sendo que a 37°C a expressão das proteínas Hrp/Hrc e secreção de efetores são maiores. *Shigella* spp. depende da osmolaridade e pH do meio em temperatura de 37°C, que é a temperatura ótima. Para EPEC a temperatura necessária também é de 37°C, porém para um aumento da aderência, secreção de proteínas e formação de lesões é necessário um pré-crescimento a 28°C. Ainda para EPEC, para uma máxima secreção de proteínas há a necessidade da presença de bicarbonato de sódio e cálcio, concentração de milimolares de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ e concentrações acima de 20 mmol/L de NH_4^+ . Os fitopatógenos e microrganismos simbioses também necessitam de condições

especiais para a secreção de proteínas *in vitro*, o que será relacionado posteriormente (CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000; HUECK, 1998).

Uma vez que as proteínas do Sistema de Secreção do Tipo III presentes em *Herbaspirillum seropedicae* apresentam maior homologia com o sistema *hrp* presente em bactérias consideradas fitopatógenos, o sistema destes microrganismos será mais detalhado a seguir.

1.5 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III EM FITOPATÓGENOS

A infecção de uma planta por um fitopatógeno pode levar à “reação de hipersensibilidade” ou ao desenvolvimento da doença. A escolha do processo é dependente da presença de pares de genes combinantes: de resistência na planta e de avirulência no patógeno. Isto gerou a hipótese de “gene para gene”, que diz que o gene de resistência da planta codifica um receptor para a proteína de avirulência da bactéria, sinalizando o início de uma cascata de eventos que irá resultar na reação de hipersensibilidade (HUECK, 1998). A “reação de hipersensibilidade” ou *hrp* é caracterizada por necrose tecidual e pela formação de compostos fenólicos e agentes antimicrobianos no local de contato com o patógeno, prevenindo a disseminação deste nas plantas resistentes (HUECK, 1998; MUDGETT & STASKAWICZ, 1998). Neste processo estão envolvidos a produção de intermediários reativos de oxigênio, alteração do fluxo de íons, o “cross-linking” oxidativo das proteínas estruturais de parede celular e a síntese de compostos antimicrobianos (HUECK, 1998; MUDGETT & STASKAWICZ, 1998).

A defesa basal do hospedeiro acontece, mesmo em plantas suscetíveis, para limitar a extensão da doença na ausência de genes de resistência (R). Sugere-se que as proteínas R atuam acelerando em geral as respostas de defesa do hospedeiro. Já foi demonstrado que em plantas hospedeiras suscetíveis, a doença se manifesta após alguns dias, enquanto que em plantas resistentes, a reação de hipersensibilidade pode ser observada após 24 horas (HUECK, 1998; CHANG et al., 2004; ALFANO & COLLMER, 1997; GALAN & COLLMER, 1999). Qualquer que seja a resposta na interação bactéria-planta, o Sistema de Secreção do Tipo III parece ser essencial para desencadear a resposta à interação.

As proteínas secretadas pelo sistema *hrp* incluem fatores essenciais para a patogenicidade, proteínas de avirulência e outros fatores não específicos. As proteínas secretadas pelo sistema não possuem peptídeo sinal, como já descrito anteriormente (KIM et al., 2003; CORNELIS & VAN GIJSEGEN, 2000; HUECK, 1998; ALFANO & COLLMER, 1997; ALFANO & COLLMER, 1996).

As primeiras proteínas identificadas, cuja secreção ocorre por este sistema, foram as “harpins” (WEI et al., 1992). Estas proteínas apresentam em comum o fato de serem estáveis ao calor, ácidas, ricas em glicina e não possuírem cisteínas. Estas, quando infiltradas em folhas de algumas plantas, estimulam resposta de hipersensibilidade não específica. Estas proteínas são secretadas em meios sintéticos que estimulam a expressão dos genes *hrp*. Alguns exemplos dessas proteínas são HrpN de *Erwinia* spp., HrpW de *Erwinia amylovora* e *P. syringae*, HrpZ de *P. syringae* e PopA de *Ralstonia solanacearum* (CORNELIS & VAN GIJSEGEN, 2000; BÜTTNER & BONAS, 2002). O papel destas proteínas não é completamente compreendido. Análises de mutação revelaram que a maioria das “harpins” não possui um controle direto da especificidade ou promoção da reação de hipersensibilidade (ALFANO & COLLMER, 1997; ALFANO & COLLMER, 1996; BÜTTNER & BONAS, 2002; VIVIAN & GIBBON, 1997). Sabe-se que HrpZ de *P. syringae* liga-se à membrana plasmática da planta e ainda que forma um poro condutor de íons em bicamadas lipídicas artificiais. Sugere-se que HrpZ forme um poro na membrana da célula por onde passa o “pili *hrp*” que será descrito posteriormente (LEE et al., 2001; BÜTTNER & BONAS, 2002).

Outro grupo de proteínas secretadas não possui a capacidade de desencadear a reação de hipersensibilidade. Como exemplos temos as proteínas DspA/E de *E. amylovora* e PopB e PopC de *R. solanacearum*, que são necessárias para a virulência destes microrganismos (CORNELIS & VAN GIJSEGEN, 2000)

Na terceira classe de proteínas secretadas se encontram as proteínas de avirulência (Avr). Sabe-se que elas são peças-chave na interação patógeno-planta, sendo responsáveis pela especificidade da interação. Estas proteínas são espécie-específicas e limitam a amplitude de hospedeiros para o patógeno (CORNELIS & VAN GIJSEGEN, 2000; ALFANO & COLLMER, 1997; VIVIAN &

GIBBON, 1997; BÜTTNER & BONAS, 2002). Para que a interação das proteínas Avr com a planta seja funcional é necessária a presença de um sistema de secreção Hrp ativo. Semelhante às proteínas efetoras Yops de *Yersinia* spp., a maioria das Avr não possui segmentos transmembrana ou peptídeos sinal e, quando aplicados em células de planta ou infiltrados em plantas, não apresentam efeito. Desta forma, a ação destas proteínas parece ser dependente do sistema *hrp* e seu sítio de ação é intracelular (CORNELIS & VAN GIJSEGEN, 2000; ALFANO & COLLMER, 1997).

Muitas proteínas Avr podem ser reconhecidas por múltiplas espécies de planta. O gene *avrRpt2* pode converter uma cepa virulenta de *P. syringae* em avirulenta para *A. thaliana* e soja (INNES et al., 1993).

Não existem evidências diretas que as proteínas Avr sejam transportadas diretamente para o citoplasma da célula eucariótica. Porém existem evidências indiretas que indicam que isso ocorra. Muitas Avr produzem reação de hipersensibilidade dependente de proteínas de resistência quando expressos dentro das células de plantas, sendo demonstrada a interação física entre uma dessas proteínas (AvrPto) e sua proteína R correspondente (GALAN & COLLMER, 1999). Além disso, existem evidências que a proteína AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* atue como um fator de transcrição no núcleo das células hospedeira (GALAN & COLLMER, 1999; BÜTTNER & BONAS, 2002)

Os genes necessários para o desenvolvimento da doença em plantas susceptíveis e para que ocorra a reação de hipersensibilidade em plantas resistentes (que são proteínas formadoras do Sistema de Secreção do Tipo III e proteínas secretadas) foram denominados de *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”). Esta denominação é mantida como padrão para o Sistema de Secreção do Tipo III em fitopatógenos (HUECK, 1998).

A maioria dos “grupamentos *hrp*” conhecidos estão localizados em regiões cromossômicas de aproximadamente 25 kb. Em alguns casos, a transferência dos genes presentes no “grupamento *hrp*” para bactérias não patogênicas, como *E. coli* e *Pseudomonas fluorescens*, são suficientes para causar a reação de hipersensibilidade, porém não a doença (ALFANO & COLLMER, 1997).

Os genes *hrp* foram caracterizados independentemente em diversos fitopatógenos, levando a uma nomenclatura que difere entre as diversas espécies, ou até no mesmo microrganismo. Com isso BOGDANOVE e colaboradores (1996) propuseram uma nomenclatura unificada com base principalmente na homologia entre algumas das proteínas do Sistema de Secreção do Tipo III, presentes em patógenos animais e fitopatógenos.

Nove genes do Sistema de Secreção do Tipo III são conservados entre os quatro principais gêneros de fitopatógenos e entre os patógenos animais (Tabela 2). Para estes genes utilizou-se a denominação *hrc* (*hrp* conservada) e a última letra conforme a homologia com as proteínas Ysc de *Yersinia* spp.. O restante dos genes do sistema são denominados *hrp* e a última letra é utilizada em ordem alfabética conforme a ordem de descobrimento (BOGDANOVE *et al.*, 1996; HUECK, 1998). Baseando-se em análises de seqüência e evidências experimentais, acredita-se que estes genes codificam uma proteína de membrana externa, uma lipoproteína associada à membrana externa, cinco proteínas de membrana interna e duas proteínas citoplasmáticas, sendo que uma delas é uma ATPase (BOGDANOVE *et al.*, 1996; HUECK, 1998).

A escolha dos genes *ysc* de *Yersinia* como padrão para a nomenclatura dos genes *hrc* é devido a maior similaridade com os respectivos genes de fitopatógenos (BOGDANOVE *et al.*, 1996).

TABELA 2: PROTEÍNAS Hrc DE FITOPATÓGENOS E SEUS CORRESPONDENTES HOMÓLOGOS EM PATÓGENOS ANIMAIS E NO SISTEMA DE BIOSÍNTESE FLAGELAR.

Fitopatógenos	<i>Yersinia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	Flagelo
HrcC	YscC	InvG	MxiD	
HrcJ	YscJ	PrgK	MxiJ	FliF
HrcN	YscN	SpaL	Spa47	FliL
HrcQ	YscQ	SpaO	Spa33	FliN, - Y
HrcR	YscR	SpaP	Spa24	FliP
HrcS	YscS	SpaQ	Spa9	FliQ
HrcT	YscT	SpaR	Spa29	FliR
HrcU	YscU	SpaS	Spa40	FliH
HrcV	LcrD	InvA	MxiA	FliA

FONTE: ALFANO, J.; COLLMER, A. **The Type III (Hrp) Secretion Pathway of Plant Pathogenic Bacteria:** Trafficking “harpins”, Avr Proteins and Deth. J. Bacteriol 1997, 179: 5655-5662.

Pode-se dividir os “clusters” *hrp* dos fitopatógenos em dois grupos de acordo com a similaridade dos genes, estrutura do operon e sistema de regulação. Desta maneira, o “cluster” de *P. syringae* e *E. amylovora* foi classificado como grupo I e o de *R. solanacearum* e *X. campestris* como grupo II. Em adição aos nove genes *hrc*, dois genes *hrp* são conservados entre os grupos I e II (ALFANO & COLLMER, 1997; MUDGETT *et al.*, 1998; BUTTNER & BONAS, 2002).

Nos fitopatógenos do grupo I os operons são ativados por HrpL, um membro da subfamília de fatores sigma. Este fator sigma alternativo é ativado por HrpS, que por sua vez é ativado por HrpR. Ambas as proteínas são ativadores transcricionais da família NtrC e em conjunto com RpoN ativam a transcrição de *hrpL*. As seqüências promotoras consenso que ligam HrpL foram denominadas de “*hrp box*”. A identificação destes promotores não é simples, por possuírem seis variações nos motivos -10 e -35 e por possuírem a região de espaçamento com diferentes comprimentos (ALFANO & COLLMER, 1997; MUDGETT *et al.*, 1998; BUTTNER & BONAS, 2002; FOUTS *et al.*, 2001; XIAO & HUTCHESON, 1994; HENDRICKSON, GUEVERA & AUSUBEL, 2000; GRIM

& PANOPOULOS, 1989; WEI & BEER, 1995; GRIM, AUFSATZ & PANOPOULOS, 1995).

Os operons de grupo II são ativados por um membro da família AraC, designado como HrpX em *X. campestris* e HrpB em *R. solanacearum*. Estes dois genes são ativados por sua vez por HrpG, que faz parte de um sistema de dois componentes e funciona como um regulador de resposta. Este sistema de regulação é encontrado em vários procariotos e possui o papel de regular a transcrição gênica para permitir a adaptação em mudanças de condições ambientais. Ele é composto por uma proteína sensora associada à membrana interna, que funciona como uma histidina quinase que, quando estimulada, se auto-fosforila e trans-fosforila a proteína reguladora de resposta, que altera seu estado de ativação (STOCK, ROBINSON & GOUDREAU, 2000). HrpG é similar a OmpR de *E. coli*, que é responsável por diferentes respostas para a adaptação à osmolaridade do meio. HrpX e HrpB se ligam a seqüências promotoras consenso denominadas de “PIP box” (“Plant Inducible Promotor”) (ALFANO & COLLMER, 1997; MUDGETT *et al.*, 1998; BUTTNER & BONAS, 2002; FURUTANI *et al.*, 2003; GENIN *et al.*, 2005; WENGELNIK, ACKERVEKEN & BONAS, 1996).

Estudos mostram que a expressão dos genes *hrp* é controlada por sinais oriundos da planta (hospedeiro) e por múltiplos fatores fisiológicos e ambientais, como pH, força osmótica e repressão catabólica (RAHME *et al.*, 1992; XIAO *et al.*, 1992). A indução dos genes do “cluster” é observada em meios com o mínimo de sais, enquanto que fontes complexas de nitrogênio, alto pH, alta osmolaridade e algumas fontes de carbono reprimem sua expressão em alguns microrganismos. Sugere-se que as condições nutricionais durante o estágio de indução da resposta de hipersensibilidade afetem a expressão dos genes *hrp*. Não existe um consenso de condições ideais para a expressão destes genes, cada bactéria responde diferentemente quando submetidas a diferentes fatores e condições (RAHME *et al.*, 1992; HUECK, 1998; LINDGREN, 1997; XIAO *et al.*, 1992).

Em *P. syringae* pv. *phaseolicola* a expressão ótima, *in vitro*, de todos os genes *hrp* ocorre em condições que se assemelham ao apoplasto de plantas, baixa osmolaridade e pH 5,5, embora menor do que a expressão encontrada na própria planta. Alterando-se a temperatura de cultivo dessas bactérias

altera-se também a expressão, diminuindo de 2 a 10 vezes quando se diminui de 30°C para 18°C (RAHME *et al.*, 1992; HUECK, 1998; LINDGREN, 1997).

Em *P. syringae* pv. *glycinea* a expressão de *avrB*, que é dependente da ativação do sistema *hrp*, é estimulada por frutose, sacarose e manitol e reprimida por citrato, succinato, L-glutamato ou peptona. Foi considerado que existe a repressão por intermediários do ciclo de ácidos tricarboxílicos (HUYNH, DAHLBRCK & STASKAWICZ, 1989). Entretanto, em *P. syringae* pv. *syringae* 61, o succinato é tão efetivo na indução quanto o glicerol (XIAO *et al.*, 1992), e em *X. oryzae* pv. *oryzae* a expressão é aumentada em meio de cultura contendo xilose (TSUGE *et al.*, 2002).

Foi também observado que em *P. syringae* pv. *syringae* 61 a fonte de nitrogênio, como sulfato de amônio ou mesmo aminoácidos, não apresentou alterações importantes nos níveis de expressão do “cluster” *hrp* (XIAO *et al.*, 1992). Já para *E. amylovora* foi demonstrado que altas concentrações de amônia, tanto sulfato quanto cloreto de amônio, e fontes como histidina e asparagina inibem a expressão dos genes do sistema de secreção do tipo III e de suas proteínas secretadas (WEI, SNEATH & BEER, 1992).

A expressão de genes em resposta a sinais de plantas e fatores ambientais e fisiológicos também ocorre em outros fitopatógenos e em bactérias capazes de simbiose com plantas. Os genes *vir* de *Agrobacterium tumefaciens* são regulados por fatores ambientais, incluindo o pH, e ainda por monossacarídeos. O gene *syrB* de *P. syringae* pv. *syringae* também pode ter sua expressão alterada por monossacarídeos. Estes dois genes e mais os genes *nod* de *Rhizobium* spp. são todos modulados por compostos fenólicos de origem vegetal. O sistema de transporte tipo III presente na maioria das bactérias do tipo rizóbio pode ser induzido por flavonóides (RAHME *et al.*, 1992; PÜHLER *et al.*, 2004)

1.6 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III EM MICRORGANISMOS SIMBIONTES

Sob condições limitantes de nitrogênio, bactérias do solo dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* formam associações simbióticas com plantas leguminosas. Essas bactérias infectam as plantas hospedeiras penetrando até o córtex da raiz, onde formam nódulos. Em troca de carboidratos esses microrganismos liberam para o hospedeiro formas de nitrogênio assimiláveis (VIPREY et al., 1998).

Os genes responsáveis pela nodulação (*nod*) e os genes responsáveis pela fixação do nitrogênio (*nif*) são peças chave na interação entre bactérias do gênero rhizobia e as plantas hospedeiras. Porém há um terceiro grupo de genes que influencia na eficiência da interação e no espectro de possíveis hospedeiros, que são os genes responsáveis por codificar as proteínas componentes do sistema de secreção do tipo III (FREIBERG et al., 1997).

Em *Rhizobium* sp. NGR234, verificou-se a presença de um cluster de genes homólogos a genes *hrc/hrp*. Esses se encontram agrupados no plasmídeo pNGR234a, adjacentes aos principais genes necessários na fixação de nitrogênio. Os genes encontrados homólogos aos genes *hrc* foram denominados de *rhc* (*Rhizobium* conserved) (VIPREY et al., 1998; FREIBERG et al., 1997).

Foi inicialmente em *Rhizobium* sp. NGR234 que se comprovou que os genes componentes do sistema de secreção do tipo III da classe rhizobia são induzíveis por flavonóides, semelhante a indução dos genes *nod*. Um dos resultados dessa indução é a secreção via sistema do tipo III de proteínas efetoras denominadas de Nops (proteínas externas de nodulação) (VIPREY et al., 1998).

A expressão dos genes codificadores do sistema de secreção e das proteínas Nops é dependente de duas proteínas, NodD1 e TtsI. Na presença de flavonóides compatíveis, NodD1 é produzido e irá se ligar a motivos específicos de DNA denominados de “*nod box*” (KOBAYASHI et al., 2004) que é encontrado a jusante de *ttsI*. Ocorre assim o estímulo de sua transcrição, dependente de NodD1 semelhante aos genes envolvidos na síntese de fatores nod. Por sua vez, *ttsI* codifica para uma proteína com características de

pertencer a um sistema de regulação de dois componentes e parece ser o ativador transcricional dos genes envolvidos na secreção de Nops, através da ligação em uma sequência conservada denominada “*tts box*” (KRAUSE, DOERFEL and GOTTFERT, 2002; MARIE et al., 2004).

1.7 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria Gram-negativa, vibrióide, algumas vezes helicoidal e muito móvel, pertencente a subdivisão β das Proteobactérias (BALDANI et al. 1986, BODDEY et al., 1995; YOUNG, 1992). É um organismo diazotrofo, ou seja, capaz de reduzir N_2 a NH_3 em uma ampla faixa de pH. Foi isolado de raízes de gramíneas, do interior de folhas e caules de cana-de-açúcar, arroz, sorgo, milho e trigo e também de plantas de abacaxi e banana (BALDANI et al. 1986, CRUZ et al., 2001). A importância do estudo desta bactéria tem aumentado em razão da sua possível utilização como biofertilizante, uma vez que o preço de fertilizantes nitrogenados constitui um alto custo econômico com insumos na produção agrícola e pode ser prejudicial ao meio ambiente (BALDANI et al., 1986; 1992; FU & BURRIS, 1989).

O nitrogênio reduzido é um componente integral de proteínas, ácidos nucléicos e muitas outras biomoléculas. A importância biológica deste elemento que é principalmente encontrado no ambiente como gás dinitrogênio (N_2), que não pode ser diretamente utilizado por nenhum eucarioto, fundamenta o estudo de microrganismos diazotróficos (BURNS & HARDY, 1975; KIM & REES, 1994).

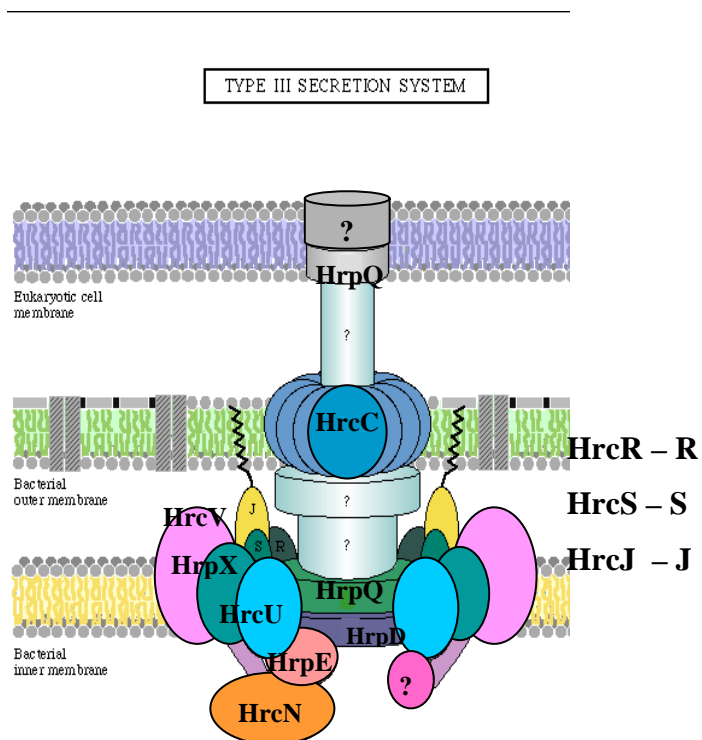
1.8 A ILHA GENOMICA *hrp/hrc* DE *Herbaspirillum seropedicae*

A partir de dados do Programa de Sequenciamento Genômico da bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* (GENOPAR), descobriu-se, em uma região de aproximadamente 28 kb, 14 genes com produtos similares a proteínas Hrp/Hrc. Nesta ilha também se encontram dois genes similares a genes *pil* e 15 são *orf* hipotéticas consideradas conservadas. Foi também encontrado um gene similar a *hrpG* fora da ilha, que codifica para um provável regulador transcricional.

Não se sabe quais as características da expressão deste agrupamento. Desconfia-se que sua expressão não seja constitutiva, porém não se conhece exatamente que fatores estão envolvidos no estímulo ou repressão da expressão.

Através da comparação dos genes encontrados em *Herbaspirillum seropedicae* com o sistema presente em *Yersinia* spp. e em fitopatógenos pode-se ter uma idéia de como estas proteínas estão configuradas na formação do sistema de transporte (FIGURA 2). Porém, como se pode ver, ainda ficam sobrando algumas lacunas. Além de não se conhecer a expressão do agrupamento *hrp* de *H. seropedicae* não existem dados suficientes para saber se estes genes codificam um sistema de transporte tipo III completo e funcional.

FIGURA 2: ARRANJO HIPOTÉTICO DAS PROTEÍNAS DO SISTEMA *hrp* DE *Herbaspirillum seropedicae*.



FONTE: KEGG ("Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome"). Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map03070.html>

NOTA: Modelo modificado para *H. seropedicae* por MONTEIRO, R. A., dados não publicados.

2. OBJETIVOS

Considerando a presença de genes homólogos a *hrp/hrc* em *Herbaspirillum seropedicae*, o objetivo deste trabalho foi analisar a região genômica *hrp/hrc* de *Herbaspirillum seropedicae* e caracterizar parcialmente os genes *hrcC*, *hrcV* e *hrpG*.

A análise da região foi feita através da comparação dos genes e Orfs e da organização da região com outros microrganismos detentores do sistema de secreção do tipo III.

Os genes *hrcC*, *hrcV* e *hrpG* foram analisados por mutação e pela construção de fusões cromossomais e plasmidiais das regiões promotoras com o gene *lacZ*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS

As bactérias utilizadas neste trabalho estão descritas nas tabelas 3 e 4.

TABELA 3: Estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*

<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
Estirpe	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
SmR1	Z78, Sm ^R , Nif ⁺	(SOUZA <i>et al.</i> , 1995)
ASD1	Mutante <i>hrcV</i> ⁻ , Tc ^r	(este trabalho)

TABELA 4: Estirpes de *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>		
Estirpe	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
DH10B	Sm ^r ; F'[<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ΔM15]	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
S17.1	Sm ^r Sp ^r Tra ⁺ <i>pro thi recA hsdR</i> , RP4-2 kan:: <i>Tn7</i> <i>tet</i> ::Mu, integrado no cromossoma	SIMON <i>et al.</i> , 1983
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> , F' <i>proAB lac1</i> ^q ZΔM15 Tn10(Tc ^r)	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989

3.2 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos utilizados estão descritos na tabela 5.

TABELA 5: Lista de plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	Genótipo	Fonte/Referência
pMP220	Tc ^r , vetor para a fusão transcricional com o gene <i>lacZ</i>	SPAINK <i>et al.</i> , 1987
pUC18	<i>lacZ</i> , <i>lacI</i> , Amp ^r	GE Healthcare
pUC19	Amp ^r , derivado do vetor pUC18 com o sítio de policlonagem invertido.	GE Healthcare
pSUP202	Amp ^r , Cm ^r , Tc ^r , origem de replicação (<i>oriT</i>) do plasmídeo RP4	SIMON <i>et al.</i> , 1983
pPW452	Tc ^r , derivado do vetor pMP220 com o sítio de policlonagem invertido	WOODLEY, Paul
pKOK6.1	Amp ^r , Cm ^r , cassete <i>lacZ</i> Km ^r	KOKOTEC & LOTZ, 1989
phrcV	Amp ^r , Cm ^r , pSUP202 contendo um fragmento de 1,6 kb <i>SaII</i> / <i>SaII</i> do gene <i>hrcV</i> obtido do clone do programa GENOPAR HS09-RN-00-000-059-E07	Este trabalho
phrcVTc	Amp ^r , Cm ^r , Tc ^r , pSUP202, <i>phrcV</i> contendo o transposon mini-Tn5 TET-1 na posição 511 do gene <i>hrcV</i>	Este trabalho
pphrcC	Tc ^r , pMP220 contendo um fragmento de 1,1kb <i>EcoRI</i> / <i>PstI</i> com região promotora do gene <i>hrcC</i> obtido do clone do programa GENOPAR HS25-RA-00-000-176-E11	Este trabalho

Plasmídeo	Genótipo/Fenótipo	Referência
<i>phrcC</i>	Amp ^r , Cm ^r , pSUP202 contendo um fragmento de 685 pb <i>Sall/SphI</i> do gene <i>hrcC</i> obtido do clone do programa GENOPAR HS24-RN-00-000-019-D03	Este trabalho
<i>phrcCTc</i>	Amp ^r , Cm ^r , Tc ^r , pSUP202, <i>phrcC</i> contendo o transposon mini-Tn5 TET-1 na posição 472 do gene <i>hrcC</i>	Este trabalho
<i>phrpG</i>	Amp ^r , Cm ^r , pSUP202 contendo um fragmento de 600 pb <i>Sall/SmaI</i> do gene <i>hrpG</i> obtido do clone do programa GENOPAR HS08-FP-00-000-012-F01	Este trabalho
<i>phrpGlacZ::Km</i>	Amp ^r , Cm ^r , Tc ^r , pSUP202, <i>phrpG</i> contendo cassete Km ^r - <i>lacZ</i> do vetor pKOK6 clonado com a enzima <i>PstI</i> na posição 407 pb do gene <i>hrpG</i>	Este trabalho
<i>pphrpG</i>	Tc ^r , pMP220 contendo um fragmento de 1,7kb <i>EcoRI/BamHI</i> com região promotora do gene <i>hrpG</i> obtido do clone do programa GENOPAR HS08-FP-00-000-012-F01	Este trabalho

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHP-malato (KLASSEN et al., 1997) adicionado de 20 mmol/L de NH₄Cl, 2 mmol/L de NH₄Cl ou 5 mmol/L de glutamato como fonte de nitrogênio e mistura de fosfatos 20x concentrada no momento do uso. As culturas foram crescidas sob agitação (120 rpm) a 30°C por 18 a 24h.

E. coli estirpes XL1Blue, DH10B, S17.1 foram cultivadas em meio líquido Luria- broth (LB) (SAMBROOK et al., 1989) ou Terrific broth (SAMBROOK et al.,

1989) sob agitação (150 rpm) ou em meio sólido MacConkey ou LA (LB contendo ágar), a 37°C.

3.3.1 Antibióticos

Foram utilizados os seguintes antibióticos nas seguintes concentrações:

TABELA 6: ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Concentração final para culturas de	Concentração final para culturas de
	<i>E. coli</i>	<i>H. seropedicae</i>
Tetraciclina (Tc)	10 µg/mL	10 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	80 µg/mL	80 µg/mL
Canamicina (Km)	100 µg/mL	500 µg/mL
Ampicilina (Amp)	200 µg/mL	-
Ácido Nalidíxico (Nal)	10 µg/mL	5 µg/mL

3.3.2 Estocagem das bactérias

Estoques das estirpes de *E. coli* e *H. seropedicae* foram feitos centrifugando 1,5 mL de cultura em tubo plástico de 1,5 mL, retirando o sobrenadante e ressuspendendo as células em 1 mL de glicerol estéril a 50%. Os estoques foram mantidos a -20°C. Os estoques de *E. coli* foram repicados uma vez ao ano e os estoques de *H. seropedicae* a cada seis meses.

As estirpes de *H. seropedicae* foram estocadas ainda em meio NFb-Malato semi-sólido suplementado com 20 mmol/L de NH₄Cl, a temperatura ambiente, sem agitação e devidamente lacrado com filme plástico.

3.4 MEIOS DE CULTURA

Composição do meio NFbHP-Malato por litro (KLASSEN et al., 1997)

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Malato de sódio	5,0g
CaCl ₂	20,0mg
Ácido nitrilo triacético	56,0mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	20,0mg
Biotina	0,1mg
Solução de Oligoelementos	10mL
Solução de fosfatos	50mL

Solução de Oligoelementos:

Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	1g
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175g
H ₃ BO ₃	1,4g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,12g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Após o preparo o meio foi autoclavado por 20 minutos a 120°C a 1atm. No momento do uso foi misturado o cloreto de amônio (1 mol/L) ou glutamato de sódio (1 mol/L) e 50 mL/L da mistura de fosfatos (159,4g/L de KH₂PO₄ e 17,8g/L de K₂HPO₄).

Para o preparo dos meios NFbHP semi-sólido e sólido foram acrescentados 0,15 e 1,5% (p/v) de ágar, respectivamente.

Composição do meio LB (Luria Bertani) por litro (SAMBROOK et al., 1989)

Tryptona	10g
Extrato de levedura	5g
NaCl	10g

Após ajuste do pH para 7 utilizando NaOH 5mol/L o meio foi autoclavado como já foi descrito. Para o preparo do meio sólido (LA) foi adicionado 1,5% (p/v) de ágar.

Composição do meio Terrific-Broth-Glucose por litro (TARTOF & HOBBS, 1987)

Tryptona	12g
Extrato de levedura	24g
Glicerol	4mL

A triptona e o extrato de levedura foram solubilizados em 900mL de água destilada e o meio foi autoclavado. Antes do uso foi acrescido de 100 mL de uma solução contendo KH_2PO_4 0,17 mol/L, K_2HPO_4 0,72 mol/L e 20 mmol/L de glucose (concentração final) previamente autoclavada.

Composição do meio SOB por litro (SAMBROOK et al, 1989)

Tryptona	20g
Extrato de levedura	5g
NaCl	0,5g
KCl	0,186g
MgCl_2	0,95g

Composição do meio SOC (SAMBROOK et al, 1989)

Utiliza-se como base o meio SOB suplementado com glucose estéril 20 mmol/L.

Composição do Plant-Medium (SAMBROOK et al, 1989).

MgCl ₂ 7H ₂ O	0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,026 g/L
Solução de microelementos	1 mL/L
Fe-EDTA (1,64%)	1 mL/L
K ₂ HPO ₄	1,5 g/L
KH ₂ PO ₄	1,5 g/L
Malato 20%	2,5mL/L

Solução de microelementos

Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1 g/L
MnSO ₄ H ₂ O	1,175 g/L
H ₃ BO ₃	1,4 g/L
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,04 g/L
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,12g/L

Os compostos foram misturados, o volume corrigido e o meio autoclavado.

Composição do meio mínimo M9 (SAMBROOK et al, 1989)

A 750 mL de água deionizada estéril (resfriada a 50°C ou menos) foram adicionados:

Sais M9 5x	200 mL
MgSO ₄ 1 mol/L	2 mL
Glucose 20%	20 mL
CaCl ₂ 1 mol/L	0,1 mL

As soluções de MgSO₄ e CaCl₂ foram preparadas e esterilizadas separadamente. As duas soluções foram adicionadas após diluição dos sais M9 5x

para um litro com água deionizada estéril. A solução de glucose foi esterilizada por filtração e adicionada a solução de sais M9 já diluída.

A solução de sais M9 5x foi feita adicionando-se os seguintes compostos em água deionizada e posteriormente a solução foi esterilizada em autoclave. As quantidades estão calculadas para um volume final de 1 litro.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	64 g
KH_2PO_4	15 g
NaCl	2,5 g
NH_4Cl	5 g

3.5 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA

3.5.1 Purificação de plasmídeos

A purificação de plasmídeos foi realizada utilizando-se o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989).

As diferentes estirpes de *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas durante a noite em meio LB ou Terrific-Broth contendo os antibióticos adequados, sob agitação a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação de 13.000 rpm por 1 minuto, ressuspensas em solução GET (Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glicose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L) e lisadas com uma solução contendo NaOH 0,2 mmol/L e SDS 1% (p/v). As proteínas, o DNA cromossomal desnaturado, os restos celulares e o SDS foram precipitados por adição de solução Kacf (acetato de potássio 3 mol/L e ácido fórmico 1,8 mol/L, pH 4,8) e manutenção do sistema em repouso no gelo por 15 min. As amostras foram, então, centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi extraído com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA plasmidial foi então precipitado com 3 volumes de etanol absoluto por 30 min e centrifugado por 10 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 80%, seco a vácuo e solubilizado em água.

3.5.2 Purificação de DNA genômico de *H. seropedicae*

O DNA genômico de *H. seropedicae* foi purificado como descrito por SOUZA (1990).

Uma cultura de *H. seropedicae* (D.O.₆₀₀ \cong 2,0), crescida em meio NFbHPN contendo os antibióticos necessários, foi centrifugada por 1 min a 13.000 rpm. As células coletadas foram lavadas com tampão TES (50 mmol/L Tris-HCl pH8,0; 20 mmol/L EDTA pH 8,0, 200 mmol/L NaCl) e incubadas a 30 °C com lisozima (100 µg/mL) durante 1 hora. As células foram lisadas pela adição de SDS 1% (p/v). A solução foi incubada com proteinase K (50 µg/mL) a 50°C por 16 horas, para a degradação das proteínas. A mistura foi extraída com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) seguida de extração com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA foi precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 80%, seco a vácuo e solubilizado em água destilada contendo 10 µg/mL de RNase.

3.5.3 Extração de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão

O procedimento descrito por Bankier et al. (1987) foi utilizado para a obtenção de fragmentos de DNA após eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão.

Após eletroforese o gel foi corado com azul de metileno 0,01%, lavado com água autoclavada (ausente de nucleases) e as bandas de DNA foram visualizadas em um transiluminador. A banda de interesse foi recortada e colocada em um tubo plástico de 1,5 mL. O gel foi fundido à temperatura de 65 °C e foi determinado o seu volume. Foram então adicionados 250 mmol/L de NaCl, 100 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 1 mmol/L de EDTA (concentração final). Esta mistura foi aquecida novamente a 65 °C para a manutenção da agarose no estado líquido, sendo então adicionado 1 volume de fenol-TE (fenol tamponado). A mistura foi agitada em “Vortex” e posteriormente centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e extraído com 1 volume de clorofórmio. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA precipitado com a adição de 1 volume de

isopropanol, em banho de gelo por 15 minutos. Após precipitação o DNA foi sedimentado por centrifugação a 13.000 rpm por mais 15 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 80%, seco e ressuspenso em água autoclavada.

3.6 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DO DNA

3.6.1 Eletroforese de DNA

Esta metodologia foi utilizada para determinar o tamanho de fragmentos de DNA ou com a finalidade de purificação de fragmentos para clonagem.

Para eletroforese foram utilizados géis de ágar (1%), agarose (0,7 a 1%) ou agarose de baixo ponto de fusão (0,7 a 1%) em tampão TAE (Tris base 40 mmol/L, ácido acético 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,0) em sistema horizontal da Hoeffer. As amostras foram diluídas em Fsuds (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75 mmol/L, Ficoll[®] 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,02%) e foram aplicadas no gel. A voltagem e o tempo de corrida variaram conforme a amostra que estava sendo analisada ou purificada.

Após eletroforese os géis de ágar ou agarose foram corados com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizadas em um transiluminador acoplado a um sistema de fotodocumentação (Biolumin Systems) utilizando luz UV. Os géis de agarose de baixo ponto de fusão foram corados com azul de metileno 0,01% por 2 minutos sob agitação e descorados com água Mili-Q[®] autoclavada até a visualização do DNA.

3.6.2 Digestão de DNA por enzimas de restrição

Para a digestão de DNA com enzimas de restrição foram utilizadas as condições especificadas pelo fabricante.

2.6.3 Preparo de plasmídeos para clonagem

Após purificação os vetores foram digeridos com as enzimas de restrição adequadas. Após a restrição, a enzima foi inativada por calor ou extraída com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi, então, precipitado com etanol, lavado com etanol 80% e seco antes de ser utilizado na reação de ligação.

2.6.4 Ligação de fragmentos de DNA nos vetores

O vetor linearizado e o fragmento de DNA de interesse devidamente cortado com as enzimas adequadas foram quantificados através de visualização após eletroforese em gel de agarose. Na reação de ligação manteve-se uma proporção 1:5 (mol) do vetor e DNA inserto, respectivamente. A reação de ligação foi realizada em presença de T4 DNA ligase e incubada a 16°C durante a noite. No caso de ligação em terminal coesivo, a mistura vetor-inserto foi aquecida a 65°C por 5 minutos e resfriada em gelo antes da adição do tampão e da enzima.

3.6.5 Seqüenciamento de DNA

Esta técnica foi utilizada para a confirmação dos clones contendo os genes e regiões promotoras de interesse obtidos do Programa GENOPAR e para localização do ponto de entrada do transposon contendo o gene que confere resistência a tetraciclina, utilizado para a obtenção de mutação nos genes *hrcC* e *hrcV*. Os fragmentos de DNA clonados em pUC19 (regiões promotoras de *hrcC* e *hrcV*, região codificadora de *hrcC* e região codificadora e promotora de *hrpG*) e as regiões a montante e a jusante ao ponto de entrada do transposon de tetraciclina foram seqüenciados utilizando os “primers” universal e reverso. O seqüenciamento foi

realizado utilizando-se o método de didesoxiribonucleotídeos marcados com cromóforos como terminadores de cadeia (SANGER *et al.*, 1977). Foi utilizado o seqüenciador automático de DNA ABI377 (Applied Biosystem).

3.6.6 Amplificação de DNA

A amplificação de DNA foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) como descrito por KOCHER & WILSON (1991).

As amplificações para sequenciamento utilizando os “primers” universal e reverso foram realizadas em termociclador Perkin-Elmer 2400 e nas seguintes condições de reação: 95°C por 1 minuto seguido de 34 repetições de 94°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto e meio.

3.7 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

3.7.1 Transformação bacteriana por eletroporação

3.7.1.1 Preparo de células eletrocompetentes

Dois e meio mililitros de uma cultura saturada foram inoculados em 250 mL de meio LB quando *E. coli*, e em meio NFbHPN quando *H. seropedicae*. A cultura foi cultivada sob agitação até D.O.₆₀₀ 0,5 -1,0. As células foram coletadas por centrifugação a 2.500 g por 5 minutos e lavadas duas vezes com água estéril gelada. Em seguida, foram ressuspensas em glicerol 15% gelado, centrifugadas novamente a 2.500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, as células foram ressuspensas no glicerol 15% restante (cerca de 350 µL), separadas em alíquotas e estocadas em freezer a -70°C.

3.7.1.2 Transformação bacteriana

Foi utilizado o método indicado pelo fabricante do eletroporador (Gibco-BRL).

Adicionou-se 1 µL da reação de ligação vetor-fragmento em 40 µL da bactéria eletrocompetente. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação e submetida a um campo elétrico (4 ΩK, 330 µF quando *E. coli* e 2,8 ΩK, 330 µF quando *H. seropedicae*), a fim de permitir a entrada do plasmídeo na bactéria. Após eletroporação as células foram ressuspensas em 1 mL de meio SOC e a suspensão transferida para um frasco de cultura. A suspensão foi incubada sob agitação por uma hora a 37°C (*E. coli*) ou a 30°C por 6 a 8 horas (*H. seropedicae*). Após incubação, *E. coli* foi plaqueada em meio sólido LA ou McConkey, enquanto *H. seropedicae* foi plaqueada em meio NFbHPN contendo os antibióticos adequados.

3.7.2 Transferência de plasmídeos por conjugação bacteriana

A transferência de plasmídeos de *E. coli* para *H. seropedicae* por conjugação foi realizada como descrito por PEDROSA e YATES (1984). Os plasmídeos a serem transferidos para as estirpes de *H. seropedicae* foram mantidos em *E. coli* S17.1 (*tra*⁺). As células foram misturadas numa proporção de 10:1 (*H. seropedicae*, receptora, e *E. coli*, doadora), em uma placa contendo 75% de NFbHP-Malato sólido e 25% de LA sem antibióticos e incubadas a 30°C por 24 horas. Posteriormente esta mistura de células foi raspada da placa, ressuspensa em 1 mL de NFbHP-Malato e plaqueada em NFbHP-Malato contendo os antibióticos necessários para a seleção dos transconjugantes.

3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.8.1 Atividade de β -Galactosidase

Para a análise da expressão dos genes *hrcC* e *hrpG*, as prováveis regiões promotoras destes genes foram clonadas em vetores pMP220 ou pPW452 a frente do gene *lacZ* sem promotor e a construção transformada em *H. seropedicae* estirpe SmR1. Desta maneira a atividade de β -galactosidase observada foi proporcional à atividade do promotor clonado.

A determinação da atividade de β -galactosidase foi realizada segundo MILLER (1990), onde cem microlitros da suspensão de células foram misturados a 900 μ L de tampão Z (Na_2HPO_4 60mmol/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40mmol/L, KCl 10mmol/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mmol/L, β -mercaptoetanol 50mmol/L e SDS 0,0027%) e 25 μ L de clorofórmio. A mistura de reação foi incubada a 30°C por 5 minutos, e a reação iniciada pela adição de 200 μ L de uma solução de *o*-nitro-fenil galactopiranosídeo (ONPG) a 4mg/mL. Após 30 minutos a reação foi interrompida com a adição de 500 μ L de Na_2CO_3 1mol/L. As leituras de absorbância foram realizadas em 420 e 550nm, sendo o primeiro específico para o *o*-nitrofenol e o segundo medido para que possamos descontar a interferência de fatores inespecíficos que possam interferir na medida, como a turbidez. A atividade foi expressa em nmol de *o*-nitrofenol produzido por minuto por miligrama de proteína no ensaio.

3.8.2 Dosagem de proteínas

A concentração das proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) usando albumina de soro bovino como padrão. As determinações das concentrações protéicas em suspensões de células foram realizadas após a lise alcalina em NaOH 0,2mol/L e incubação por pelo menos uma hora a temperatura ambiente.

3.9 OBTENÇÃO DO MUTANTE *hrcV* DE *H. seropedicae*

A estratégia utilizada para a obtenção deste mutante foi a recombinação homóloga dupla. Utilizou-se um plasmídeo suicida (pSUP202) contendo o gene *hrcV* mutado pela inserção de um transposon com a resistência a tetraciclina (TET-1). Com a inserção desta construção na estirpe selvagem de *H. seropedicae* (SmR1) ocorre o fenômeno de “cross-over”, que pode ser simples ou duplo. Com isso haverá a inserção do cassete de resistência a tetraciclina no gene *hrcV* do cromossoma da bactéria.

3.9.1 Construção do plasmídeo phrcVTc

A construção com o gene *hrcV* mutado foi feita em um vetor suicida pSUP202. O fragmento do gene *hrcV* utilizado foi obtido do clone HS09-RN-00-000-059-E07 do programa GENOPAR. O clone produzido apresentou o gene *hrcV* deletado nos últimos 470 pb. O clone foi digerido com a enzima *SaI* para a liberação de um fragmento de aproximadamente 1,3 kb, referente a *hrcV* sem 270 pb do início e sem 470 pb finais. Este fragmento foi ligado em vetor pSUP202 digerido com *SaI*. Como o sítio de restrição *SaI* do vetor fica dentro do gene responsável pela resistência a tetraciclina, o clone de interesse foi selecionado pela perda de

resistência ao antibiótico em questão e posteriormente analisado por restrição com a liberação do inserto. Este plasmídeo foi denominado de *phrcV*.

Em seguida o plasmídeo *phrcV* foi utilizado para a reação de inserção de transposon TET-1 (EZ-Tn5, EPICENTRE) conforme indicado pelo fabricante. O plasmídeo resultante foi denominado de *phrcVTc* e foi transformado em *E. coli* estirpe S17.1. A transferência para *H. seropedicae* estirpe SmR1 foi feita por conjugação como já descrito acima.

3.10 CONSTRUÇÃO DO VETOR SUICIDA PARA A MUTAÇÃO DE *hrcC*

Foi utilizada a mesma estratégia desenvolvida para a mutação do gene *hrcV*. A construção com o gene *hrcC* mutado foi feita em um vetor suicida pSUP202. O fragmento do gene *hrcC* utilizado foi retirado do clone HS24-RN-00-000-019-D03 do programa GENOPAR, em pUC19. Este possui 1,1 kb iniciais do gene. Ambos, o vetor e o clone com o inserto, foram tratados com as enzimas *Sall* e *SphI*, para a liberação e clonagem de um fragmento de 560 pb. Este fragmento corresponde ao gene *hrcC* sem 380 pb iniciais e 1 kb final. O clone foi selecionado por sensibilidade a tetraciclina e confirmado por perfil de restrição. O plasmídeo resultante foi denominado de *phrcC*.

Em seguida o plasmídeo *phrcC* foi utilizado para reação de inserção de transposon TET-1 (EZ-Tn5, EPICENTRE), conforme descrito pelo fabricante. Os plasmídeos das colônias transformantes foram extraídos e analisados por restrição para a seleção daqueles onde o cassete de tetraciclina foi inserido no gene *hrcC*. O plasmídeo resultante foi denominado de *phrcCTc*.

3.11 CONSTRUÇÃO DO VETOR SUICIDA PARA A MUTAÇÃO DE *hrpG* E FUSÃO CROMOSSOMAL DE *hrpG::lacZ*

O clone HS08-FP-00-000-012-F01 do programa GENOPAR, em pUC19, que possui o gene *hrpG* completo, foi tratado com as enzimas *Sall* e *SmaI*. Com isso houve a liberação de um fragmento de 610 pb, correspondendo ao gene *hrpG* sem os 64 pb iniciais e os 46 pb terminais. O vetor pSUP202 foi tratado com as enzimas *Sall* e *EcoRV*. O vetor linearizado e o inserto foram ligados e transformados em *E. coli* estirpe DH10B. As colônias transformantes foram selecionadas pela sensibilidade a tetraciclina. Os clones sensíveis foram confirmados por perfil de restrição. O plasmídeo resultante foi denominado de *phrpG*.

O clone *phrpG* foi utilizado para uma reação de digestão parcial com a enzima *PstI*, pois no interior do gene clonado existem dois sítios de restrição para esta enzima. Em paralelo o vetor pKOK6 foi tratado com a mesma enzima, para a liberação do cassete $Km^r::lacZ$. Ambas as reações de restrição foram tratadas com uma solução contendo fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), precipitadas com etanol absoluto, lavadas com etanol 80%, secas, ressuspensas em água e utilizadas para a reação de ligação. A mistura de reação foi transformada em *E. coli* estirpe DH10B e os clones resultantes foram inicialmente selecionados pela resistência a canamicina e posteriormente pelo perfil de restrição. Os clones selecionados, que possuíam o cassete $Km^r::lacZ$ no interior do gene *hrpG*, foram submetidos a diferentes enzimas de restrição para descobrir o ponto de entrada e orientação da entrada do cassete. Este plasmídeo foi denominado de *phrpG* $lacZ::Km$ e foi transformado em *E. coli* estirpe S17.1 para posterior conjugação com *H. seropedicae* estirpe SmR1.

3.12 HIBRIDIZAÇÃO DE DNA

3.12.1 Transferência do DNA do gel para a membrana de nylon

A transferência do DNA para a membrana de nylon foi feita por capilaridade ascendente como descrito por Sambrook et al. (1989). O DNA cromossomal de *H. seropedicae* estirpe SmR1 e do provável mutante foram digeridos com *Sa*I ou *Sac*II. O DNA genômico cortado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão TAE. O gel foi corado com brometo de etídio, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado. O gel foi tratado com HCl 0,125mol/L por 7 minutos, depois com solução desnaturante (NaCl 1,5 mol/L e NaOH 0,5 mol/L) por 30 minutos e com solução neutralizante (1,5 mol/L, Tris-HCl, pH 7,2, 0,5 mol/L NaCl e Na₂EDTA 0,001 mol/L) por mais 30 minutos. Todas as incubações foram realizadas a temperatura ambiente e sob agitação. O DNA presente no gel foi então transferido para uma membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham) por capilaridade, utilizando solução 10x SSC (3 mol/L NaCl e 0,3 mol/L citrato de sódio, pH 7) durante a noite. A membrana com o DNA foi então exposta à luz ultravioleta por 4 minutos, lavada com água autoclavada e seca a temperatura ambiente.

3.12.2 Marcação do DNA sonda com [³²P]

O vetor phrcVTc digerido com a enzima *Sa*I foi utilizado como sonda no experimento de hibridização de DNA. O vetor digerido foi submetido a uma eletroforese para a quantificação de DNA. Um volume de 10 µL, aproximadamente 25 ng, de DNA sonda foi submetido à desnaturação pelo calor em banho fervente por 10 minutos e rapidamente resfriados em banho de gelo. Os 10 µL do DNA desnaturado foram submetidos a uma reação de marcação em um sistema de 25µL contendo ainda 5,75µL de água, 5 µL de tampão OLB (Tris-HCl 1,25mol/L pH 8,0,

MgCl₂ 0,0125mol/L, 2-mercaptoetanol 0,1%, dATP, dGTP, dTTP (100 µmol/L), 0,25 µL de “random primers” (0,3 µmol/L), 1 µL de BSA (10 mg/mL), 2,5 µL de α[³²P]dCTP (10 µCi/µL) e 0,5 µL de Klenow DNA polimerase (2U). A reação foi finalizada com o aquecimento da mistura a 65 °C por 10 minutos.

3.12.3 Hibridização DNA /DNA

A membrana contendo o DNA foi colocada em um tubo de hibridização e incubada com 15 mL de solução de pré-hibridização (SSC 6x, solução de Denhardt 5x, SDS 0,5% e 20 µg/mL de DNA de esperma de salmão sonificado e desnaturado) por 12 a 15 horas em um forno de hibridização Hybaid sob agitação rotatória e a 65 °C. Em seguida, o DNA sonda marcado e desnaturado (em banho fervente por 10 minutos) foi adicionado à solução de pré-hibridização. A membrana foi incubada novamente a 65 °C por 24 horas. A membrana foi lavada três vezes com solução de lavagem (SSC 0,2x, SDS 0,1%) por 30 minutos a 65 °C. Após lavagem, a membrana foi exposta no sistema tipo PhosphorImager (Storm Densitometer – Amersham Pharmacia Biotech) para a detecção dos sinais de hibridização.

3.13 ENSAIOS DE CAPACIDADE DE INVASÃO E COLONIZAÇÃO EM PLANTA

A planta selecionada para os ensaios de capacidade de invasão e colonização do *H. seropedicae* estirpe ASD1 (mutante *hrcV*⁻) foi o milho (*Zea mays*). A semente utilizada foi a BR1020 da Agrocere.

3.13.1 Descontaminação das sementes e germinação

As sementes de milho foram descontaminadas externamente através de lavagem com etanol 70% por 1 minuto sob agitação e, posteriormente, em solução contendo hipoclorito 12% e 0,002% de Tween 20 por 20 minutos sob agitação e a temperatura ambiente. Em seguida as sementes foram lavadas quatro vezes com água estéril por 20 minutos cada, também sob agitação.

Para a germinação das sementes foi utilizado um bloco plástico de 96 poços de 1 mL, contendo pedaços de papel filtro para servirem como suporte para as sementes. Todo o material foi previamente esterilizado em autoclave. Os papéis de filtro foram embebidos em Plant-Medium e as sementes descontaminadas foram colocadas sobre o mesmo. O material foi incubado em câmara de germinação (TECNAL, TE-401) com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro a 25 °C por 3 dias. Nestas condições as sementes germinadas apresentaram raízes com média de 5 cm de comprimento.

3.13.2 Inoculação das plantas com *H. seropedicae*

Após a germinação, as plantas foram incubadas em frascos Erlenmeyers contendo 25 mL de culturas saturadas de *H. seropedicae* selvagem (SmR1) e *hrcV* (ASD1) por 1 hora em estufa a 30 °C. Após o tempo de incubação, as plantas foram retiradas, recolocadas no suporte com papel embebido em meio e incubadas novamente a 25 °C em câmara de germinação por mais 3 dias. As plantas que serviram como controle negativo não sofreram a etapa de inoculação, elas passaram diretamente para a incubação por 3 dias.

3.13.3 Descontaminação externa das raízes e quantificação de bactérias

Após o período de incubação, as plantas sofreram uma descontaminação externa em etanol 70% por 5 minutos e em solução contendo hipoclorito 2,5% e Tween 20 0,002% por 1 minuto. Em seguida foram lavadas três vezes em água estéril por 1 minuto. A raiz da planta foi destacada da semente e macerada em 1 mL de solução salina. A suspensão resultante da raiz macerada foi diluída a 10^{-3} e 10^{-5} e plaqueada em meio NFb-HP – Malato sólido, contendo 20 mmol/L de NH_4Cl , solução de fosfatos e estreptomicina (Sm) como antibiótico. As placas foram incubadas a 30 °C e após 24h e 48h foram contados o número de colônias resultantes.

3.14 CONSTRUÇÃO DA FUSÃO *hrcC* :: *lacZ*

A fusão do promotor do gene *hrcC* com o gene *lacZ* foi feita em vetor pMP220. O vetor foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *PstI*. Para a obtenção da região promotora do gene de interesse foi utilizado o clone HS25-RA-00-000-176-E11 do programa GENOPAR. Após digestão com as mesmas enzimas utilizadas para o vetor, um fragmento de aproximadamente 1,1 kb, correspondendo a 521 pb da região promotora e 580 pb da região codificadora da proteína HrcC foi obtido. Este fragmento foi ligado ao vetor pMP220. A construção resultante foi denominada de *pphrcC*.

Esta construção foi utilizada para ensaios de atividade de β -Galactosidase utilizando-se NFbHP com malato, succinato e citrato (0,028 mol/L) como fontes de carbono. Variaram-se ainda as fontes de nitrogênio e suas concentrações, NH_4Cl 20 mmol/L, NH_4Cl 2 mmol/L e glutamato 5mmol/L, e ainda utilizando a concentração normal da mistura de fosfatos e um décimo da concentração.

3.15 CONSTRUÇÃO DA FUSÃO *hrpG* :: *lacZ*

Para a análise de expressão de *hrpG* foi feita uma fusão da sua região promotora com o gene *lacZ*, em vetor pMP220. O clone HS08-FP-00-000-012-F01 do programa GENOPAR foi tratado com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, para a liberação de um fragmento de 1,7 kb, que corresponde a 938 pb da região promotora e o gene *hrpG* completo. O vetor foi digerido utilizando-se as enzimas *EcoRI* e *BglII*. A ligação e a transformação em *E. coli* foram realizadas conforme descrito anteriormente. A clonagem do fragmento de 1,7 kb foi confirmada por análise de restrição. O plasmídeo resultante recebeu o nome de p*phrpG*.

3.16 ENSAIO DE ATIVIDADE DA FUSÃO *hrcC*::*lacZ* POR CONTATO PLANTA-BACTÉRIA

A descontaminação das sementes de milho e a germinação foram feitas como descrito no item 3.15.1.

3.16.1 Ensaio da fusão em cultura após contato com raízes de milho

Culturas de *H. seropedicae* estirpe selvagem SmR1, transformadas com o vetor pMP220 ou com a fusão *hrcC*::*lacZ* foram cultivadas em 10 mL de meio NFbHP-Malato suplementado com os devidos antibióticos, NH₄Cl 2 mmol/L e um décimo da mistura de fosfatos por 14 a 16 horas a 30 °C. Após este período, uma alíquota da cultura foi retirada e analisada para atividade de β -galactosidase (item 3.10.1). A atividade de β -galactosidase obtida foi considerada como sendo o valor no

tempo zero do ensaio. A cultura de bactérias foi então colocada em contato com a raiz de milho em três condições diferentes: o milho germinado foi colocado diretamente na cultura; o milho germinado foi colocado em um tubo de diálise em meio NFbHP malato e esse sistema foi então colocado na cultura; ou a raiz do milho foi emblocada em agarose 1% e o bloco contendo a raiz foi colocado na cultura. Posteriormente a cultura com a planta foi incubada a 30 °C sob agitação, sendo retiradas amostras para ensaio da atividade de β -galactosidase nos tempos de 1, 3 e 5 horas.

3.16.2 Ensaio de atividade do *H. seropedicae* contendo a fusão *hrcC::lacZ* aderidos à raiz

As estirpes selvagem, selvagem com o vetor pMP220 e selvagem com a fusão pp*hrcC* foram inoculadas em 10 mL de meio NFbHP-Malato suplementado com os devidos antibióticos, NH₄Cl 20 mmol/L e a mistura de fosfatos, e incubadas nas condições apropriadas por 14 a 16 horas. Três mililitros desta cultura foram transferidas para novos frascos contendo 7 mL de meio NFbHP-Malato contendo a mistura de fosfatos e NH₄Cl 20 mmol/L e incubados por mais 2 a 3 horas. Em seguida as plantas germinadas foram colocadas nas culturas. Nos tempos de 1,5, 3,5 e 20 horas uma das plantas foi retirada e teve a raiz destacada. A raiz foi sonicada por aproximadamente 10 segundos em um tubo contendo 1,5 mL de meio NFbHP-Malato para a retirada das bactérias aderidas a ela. Este meio foi transferido para tubos plásticos de 1,5 mL e centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de meio NFbHP-Malato para os ensaios de β -galactosidase e dosagem de proteínas.

3.17 PROGRAMAS DE BIOINFORMÁTICA

Foram utilizados os programas de bioinformática disponíveis livremente na Internet. O programa Artemis (Sanger Institute) foi utilizado para a análise estrutural da provável ilha de patogenicidade de *H. seropedicae*, bem como para a comparação com agrupamentos *hrp* de outros microrganismos (sintenia). A presença de tRNA foi pesquisada utilizando-se o programa tRNAscan-SE. Já a pesquisa de promotores foi realizada utilizando o PromScan. Para a análise de domínios das proteínas encontradas no sistema foi utilizado o programa SMART. (RUTHERFORD *et al*, 2000; LOWE & EDDY, 1997; <http://www.promscan.uklinux.net>; LETUNIC *et al.*, 2006; SCHULTZ *et al.*, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANALISE DA ILHA DE GENÔMICA DE *Herbaspirillum seropedicae*

A chamada ilha de patogenicidade de *H. seropedicae* encontra-se em uma região de aproximadamente 28kb no genoma da bactéria e compreende 31 prováveis genes ou *orfs* (Figura 3). Destes, 14 genes apresentam produto homólogo a proteínas componentes do Sistema de Secreção do tipo III, denominadas de Hrp; 2 genes possuem homologia com genes codificadores de proteínas componentes do sistema de secreção de pili e os outros 15 são *orfs* consideradas hipotéticas conservadas. Um gene homólogo a *hrpG*, cujo produto é um provável regulador da expressão dos genes presentes na ilha, é encontrado fora da ilha de patogenicidade.

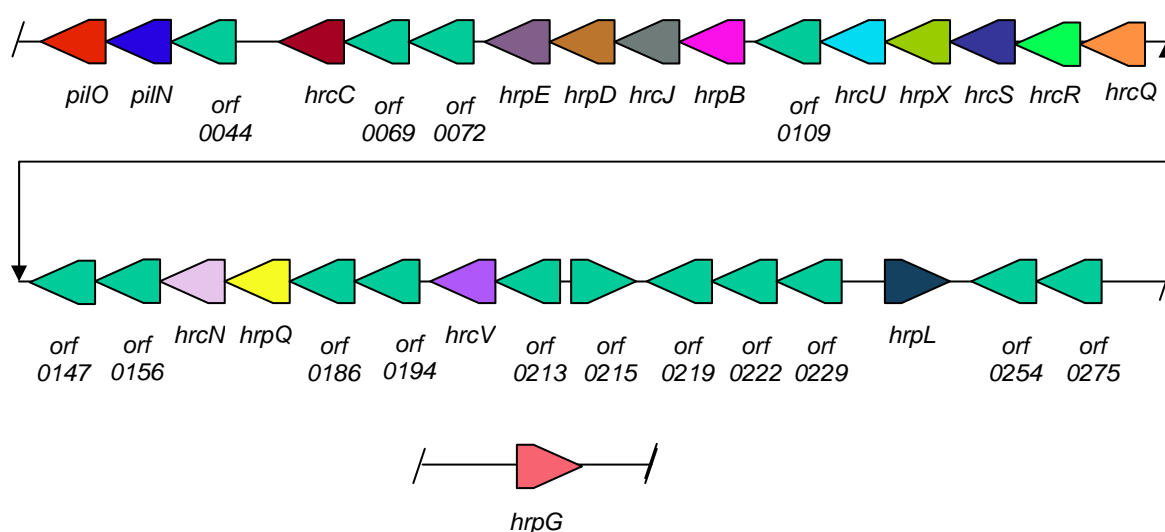


FIGURA 3: ORGANIZAÇÃO DOS GENES *hrc/hrp* DE *H. seropedicae*. A denominação dos genes foi adotada por similaridade com genes descritos. Genes considerados hipotéticos ou hipotéticos conservados são indicados como *orfs* numeradas. O gene *hrpG* encontra-se em região não adjacente aos demais genes.

Normalmente, as ilhas de patogenicidade apresentam um conteúdo de C+G diferente do restante do genoma (HACKER & KAPER, 2000; HACKER et al., 1997) e elementos de transposição ou de mobilidade e genes codificadores de RNA transportadores localizados adjacentes à ilha (HACKER & KAPER, 2000; HOU,

1999). Estas características fortalecem a possibilidade de aquisição da sequência por transferência horizontal. Entretanto, a análise da ilha de patogenicidade de *H. seropedicae* mostra um conteúdo de C+G de aproximadamente 65, semelhante ao restante do genoma e ausência de elementos de transposição. Da mesma forma, a preferência do uso de codons desta região não é diferente do restante do genoma. Estas características não desclassificam necessariamente esta região como uma ilha de patogenicidade, mas sim podem indicar uma transferência horizontal mais longínqua.

Análise dos produtos dos genes presentes na ilha de patogenicidade de *H. seropedicae* mostra que existe uma maior similaridade destas com as proteínas Hrp presente em fitopatógenos e microrganismos simbióticos e associativos (Tabelas 4 e 5). Estas provavelmente são as constituintes do maquinário do sistema de transporte transmembrana do tipo III, envolvido na interação planta-bactéria.

As proteínas Hrp/Hrc são responsáveis pela composição do maquinário do sistema de transporte do sistema de secreção (HUECK, 1998; ALFANO & COLLMER, 1996; LINDGREN, PEET & PANOPOULOS, 1986). O núcleo principal para o transporte é composto de um poro de membrana externa formado por HrcC, um poro de membrana interna formado por HrcV e uma ATPase, HrcN. O restante das proteínas formadoras do sistema encontram-se ligadas à membrana interna e possuem uma função acessória, pouco determinada (HUECK, 1998; ALFANO & COLLMER 1997). Dentro do “cluster” normalmente também encontram-se os genes que codificam as proteínas que são secretadas, porém em *H. seropedicae* estas não foram encontradas.

4.1.1 Análise dos produtos dos genes presentes na ilha de patogenicidade de *H. seropedicae*

Os produtos dos genes localizados nesta região genômica de *H. seropedicae* foram comparados com o banco de dados GenBank. O resultado é apresentado na TABELA 6 e os resultados da análise para HrpG é apresentada separadamente na TABELA 7, uma vez que este gene está localizado fora da ilha de patogenicidade.

Como podemos verificar na TABELA 6 e 7 as proteínas das classes Hrp/Hrc e Pil de *H. seropedicae* apresentaram-se conservadas, com similaridade com as proteínas de fitopatógenos (*Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *tomato* e *Ralstonia solanacearum*), patógenos animais (*Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* e *Burkholderia pseudomallei*) e simbióticos (*Bradyrhizobium japonicum*).

HrpD, HrpB e HrcQ apresentaram uma baixa similaridade quando comparada às proteínas de outros sistemas *hrp*. O produto da *orf* 224.0044 apresentou baixa similaridade com a proteína PilL de *Burkholderia mallei*. Duas *orf* apresentaram homologias muito baixas, com um valor esperado positivo, *orf*224.0069 e *orf*224.0156. A primeira apresenta homologia com HrpG de *P. syringae*, que diferentemente da proteína de mesmo nome de *Xanthomonas* spp. e *R. solanacearum*, é uma chaperona que faz parte do sistema de secreção (WEI, DENG & HUANG, 2005). Já a segunda apresenta homologia a HrpO de *E. pyrifoliae*, que não possui função conhecida.

Comparativamente, os genes presentes na ilha de patogenicidade de *H. seropedicae* apresentaram uma maior similaridade com os encontrados em fitopatógenos, seguido de patógenos animais e por último de microrganismos simbiotes.

As demais *orfs* encontradas não apresentaram similaridade com genes depositados no banco de dados GenBank e foram consideradas hipotéticas. Entretanto, como não existe homologia entre as proteínas secretadas por este sistema e também entre as proteínas formadoras da agulha *hrp*, é possível que algum destes genes também faça parte deste sistema, ou ainda sejam importantes na interação planta-bactéria.

TABELA 7: SIMILARIDADE ENTRE OS PRODUTOS DOS GENES DO “CLUSTER” *hrp* DE *Herbaspirillum seropedicae* E DE OUTRAS BACTÉRIAS.

Microrganismo	Proteínas similares ao sistema Hrp de <i>H. seropedicae</i>												
	PilO	PilN	HrcC	HrpE	HrcJ	HrcU	HrpX	HrcS	HrcR	HrcN	HrpQ	HrcV	HrpL
<i>P. aeruginosa</i>	PilO ²¹ (40/24)	PilN ³ (61/40)	PulD ⁸ (46/27)		EscJ ²² (61/38)	EscU ³² (52/29)	EscT ⁴² (49/30)	EscS ⁵³ (70/48)	EscR ⁶¹ (66/45)	PscN ⁷² (70/52)		MxiA ⁸⁶ (60/39)	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	PilO ² (49/36)	PilN ⁴ (63/45)	PulD ⁹ (47/30)	FliH ¹⁸ (41/27)	SctJ ²³ (58/39)	SctU ³³ (54/33)	SctT ⁴³ (42/25)		SctR ⁶² (65/41)	SctN ⁷³ (66/50)		EscV ⁸⁷ (57/38)	RpoE ⁹⁶ (50/32)
<i>E. coli</i>		PilN ⁵ (49/31)	EscC ¹⁰ (43/23)		EscJ ²⁴ (50/25)	EscU ³⁴ (50/30)	EscT ⁴⁴ (43/24)		EscR ⁶³ (63/42)	EscN ⁷⁴ (63/46)		EscV ⁸⁸ (63/41)	RpoE ⁹⁷ (48/31)
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>		PilN ⁶ (43/26)				HrcU ³⁵ (57/37)	HrcT ⁴⁵ (56/30)	HrcS ⁵⁴ (77/52)	HrcR ⁶⁴ (68/46)	HrcN ⁷⁵ (73/58)	HrpQ ⁸² (53/40)	HrcV ⁸⁹ (62/42)	HrpL ⁹⁸ (55/35)
<i>Erwinia chrysanthemi</i>			HrcC ¹¹ (41/21)	HrpE ¹⁹ (36/23)	HrcJ ²⁵ (72/53)	HrcU ³⁶ (58/37)	HrcT ⁴⁶ (56/30)	HrcS ⁵⁵ (80/54)	HrcR ⁶⁵ (67/45)		HrpQ ⁸³ (50/39)		HrpL ⁹⁹ (53/34)
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>			HrcC ¹² (55/36)	HrpE ²⁰ (46/29)	HrcJ ²⁶ (70/48)	HrcU ³⁷ (57/36)	HrcT ⁴⁷ (53/27)	HrcS ⁵⁶ (73/45)	HrcR ⁶⁶ (72/51)	HrcN ⁷⁶ (71/57)	HrpQ ⁸⁴ (54/33)	HrcV ⁹⁰ (63/43)	HrpL ¹⁰⁰ (53/31)
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>			HrcC ¹³ (53/34)	HrpE ²¹ (45/31)	HrcJ ²⁷ (70/50)	HrcU ³⁸ (60/36)	HrcT ⁴⁸ (53/26)	HrcS ⁵⁷ (73/45)	HrcR ⁶⁷ (72/51)	HrcN ⁷⁷ (74/59)	HrpQ ⁸⁵ (57/38)	HrcV ⁹¹ (63/42)	HrpL ¹⁰¹ (53/33)
<i>Y. enterocolitica</i>			YscC ¹⁴ (46/28)		YscJ ²⁸ (63/36)	YscU ³⁹ (49/29)	YscT ⁴⁹ (47/28)	YscS ⁵⁸ (69/44)	YscR ⁶⁸ (65/45)	YscN ⁷⁸ (69/51)		LcrD ⁹² (65/42)	
<i>R. solanacearum</i>			HrcC ¹⁵ (47/27)		HrcJ ²⁹ (60/40)	HrcU ⁴⁰ (56/36)	HrcT ⁵⁰ (44/24)		HrcR ⁶⁹ (67/43)	HrcN ⁷⁹ (65/48)		HrcV ⁹³ (53/34)	Fator σ -24 ¹⁰² (50/31)
<i>S. enterica</i>		PilNa ⁷ (53/33)	SsaC ¹⁶ (55/33)		SsaJ ³⁰ (55/31)		SsaT ⁵¹ (43/25)	SsaS ⁵⁹ (71/46)	SsaR ⁷⁰ (53/46)	SsaN ⁸⁰ (65/49)		InvA ⁹⁴ (58/38)	Fator σ -24 ¹⁰³ (48/32)
<i>B. japonicum</i>			RhcC1 ¹⁷ (52/33)		RhcJ ³¹ (66/42)	FliH ⁴¹ (50/30)	RhcT ⁵² (46/26)	RhcS ⁶⁰ (62/46)	RhcR ⁷¹ (65/41)	RhcN ⁸¹ (64/46)		RhcV ⁹⁵ (59/35)	Fator σ -70 ¹⁰⁴ (50/28)

NOTA: Resultados obtidos utilizando o programa BLASTp com os parâmetros em default.

- Os resultados entre parênteses são a % de aminoácidos similares/ % de aminoácidos idênticos das regiões alinhadas.

Os valores de 1 a 104 correspondem ao número de acesso do GenBank: ¹gi|52213036|emb|CAH39074.1, ²gi|37955690|gb|AAP22529.1, ³gi|37955689|gb|AAP22528.1, ⁴gi|52422175|gb|AAU45745.1, ⁵gi|46949078|gb|AAT07432.1, ⁶gi|49610010|emb|CAG73449.1, ⁷gi|32454458|gb|AAP83030.1, ⁸gi|11772618|gb|AAC31975.1, ⁹gi|67680836|ref|ZP00475294.1, ¹⁰gi|54311608|emb|CAG17523.1, ¹¹gi|581156|emb|CAA46370.1, ¹²gi|42562008|gb|AAS20450.1, ¹³gi|3228547|gb|AAC34756.1, ¹⁴gi|4324359|gb|AAD16836.1, ¹⁵gi|83747847|ref|ZP00944880.1, ¹⁶gi|62179985|ref|YP216402.1, ¹⁷gi|12620518|gb|AAG60794.1, ¹⁸gi|76578492|gb|ABA47967.1, ¹⁹gi|21311404|gb|AAM46698.1, ²⁰gi|42562011|gb|AAS20453.1, ²¹gi|28868594|ref|NP791213.1, ²²gi|53727841|ref|ZP00347989.1, ²³gi|14719872|gb|AAK73236.1, ²⁴gi|13364048|dbj|BAB37996.1, ²⁵gi|21311402|gb|AAM46696.1, ²⁶gi|42562013|gb|AAS20455.1, ²⁷gi|28868592|ref|NP791211.1, ²⁸gi|14579365|gb|AAK69242.1, ²⁹gi|17431339|emb|CAD18018.1, ³⁰gi|62180000|ref|YP216417.1, ³¹gi|27350066|dbj|BAC47078.1, ³²gi|84328011|ref|ZP00976022.1, ³³gi|76584195|gb|ABA53669.1, ³⁴gi|13364055|dbj|BAB38003.1, ³⁵gi|49611530|emb|CAG74978.1, ³⁶gi|28628135|gb|AAO34619.1, ³⁷gi|42562005|gb|AAS20447.1, ³⁸gi|28868600|ref|NP791219.1, ³⁹gi|14579353|gb|AAK69230.1, ⁴⁰gi|17431336|emb|CAD18015.1, ⁴¹gi|27355158|dbj|BAC52142.1, ⁴²gi|84321655|ref|ZP00970010.1, ⁴³gi|76583079|gb|ABA52553.1, ⁴⁴gi|2865278|gb|AAC38371.1, ⁴⁵gi|49611531|emb|CAG74979.1, ⁴⁶gi|28628134|gb|AAO34618.1, ⁴⁷gi|42562004|gb|AAS20446.1, ⁴⁸gi|11276518|gb|AAG33886.1, ⁴⁹gi|14579352|gb|AAK69229.1, ⁵⁰gi|17431344|emb|CAD18023.1, ⁵¹gi|62180012|ref|YP216429.1, ⁵²gi|27350074|dbj|BAC47086.1, ⁵³gi|53727829|ref|ZP00347985.1, ⁵⁴gi|49611532|emb|CAG74980.1, ⁵⁵gi|28628133|gb|AAO34617.1, ⁵⁶gi|42562003|gb|AAS20445.1, ⁵⁷gi|11276517|gb|AAG33885.1, ⁵⁸gi|4324352|gb|AAD16829.1, ⁵⁹gi|16502787|emb|CAD01945.1, ⁶⁰gi|27350073|dbj|BAC47085.1, ⁶¹gi|53727830|ref|ZP00139326.2, ⁶²gi|4206078|gb|AAD11411.1, ⁶³gi|17384635|emb|CAC81847.1, ⁶⁴gi|49611533|emb|CAG74981.1, ⁶⁵gi|28628132|gb|AAO34616.1, ⁶⁶gi|42562002|gb|AAS20444.1, ⁶⁷gi|11276516|gb|AAG33884.1, ⁶⁸gi|14579350|gb|AAK69227.1, ⁶⁹gi|17431332|emb|CAD18011.1, ⁷⁰gi|62180010|ref|YP216427.1, ⁷¹gi|27350072|dbj|BAC47084.1, ⁷²gi|AAB86534.1, ⁷³gi|14719869|gb|AAK73233.1, ⁷⁴gi|17384650|emb|CAC81862.1, ⁷⁵emb|CAG74985.1, ⁷⁶emb|CAD22886.1, ⁷⁷ref|NP791227.1, ⁷⁸ref|NP863523.1, ⁷⁹gi|17431342|emb|CAD18021.1, ⁸⁰gi|62127639|gb|AAX65342.1, ⁸¹gi|27350069|dbj|BAC47081.1, ⁸²gi|49611538|emb|CAG74986.1, ⁸³gi|28628127|gb|AAO34611.1, ⁸⁴gi|42561996|gb|AAS20438.1, ⁸⁵gi|11276510|gb|AAG33878.1, ⁸⁶gi|15809502|gb|AAK53939.1, ⁸⁷gi|67649409|ref|ZP00447633.1, ⁸⁸gi|84328024|ref|ZP00976035.1, ⁸⁹gi|49611539|emb|CAG74987.1, ⁹⁰gi|42561995|gb|AAS20437.1, ⁹¹gi|28868610|ref|NP791229.1, ⁹²gi|14579339|gb|AAK69216.1, ⁹³gi|16503974|emb|CAD06003.1, ⁹⁴gi|27350053|dbj|BAC47065.1, ⁹⁵gi|43469126|gb|AAS46625.1, ⁹⁶gi|75513183|ref|ZP00735625.1, ⁹⁷gi|75513183|ref|ZP00735625.1, ⁹⁸gi|49611541|emb|CAG74989.1, ⁹⁹gi|21311396|gb|AAM46690.1, ¹⁰⁰gi|71553809|gb|AAZ33020.1, ¹⁰¹gi|13325078|gb|AAG33875.2, ¹⁰²gi|17428068|emb|CAD14757.1, ¹⁰³gi|16503799|emb|CAD02789.1, ¹⁰⁴gi|27351300|dbj|BAC48307.1.

TABELA 8 – SIMILARIDADE ENTRE A PROTEÍNA HrpG DE *H. seropedicae* E AQUELAS ENCONTRADAS EM OUTROS ORGANISMOS

Microrganismo	Proteínas homólogas a HrpG de <i>H. seropedicae</i>
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	HrpG (50/35) ¹
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	HrpG (50/35) ²
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	HrpG (52/36) ³
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	HrpG (53/36) ⁴
<i>Ralstonia solanacearum</i>	HrpG (51/35) ⁵
<i>Burkholderia</i> sp. 383	Regulador transcricional de dois componentes, “winged helix family” (48/29) ⁶
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Regulador de resposta de ligação ao DNA QseB (51/31) ⁷
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Provável regulador de resposta de dois componentes (47/29) ⁸

NOTA: Entre parênteses estão indicadas as porcentagens de similaridade e identidade, respectivamente, das proteínas comparadas.

Numero de acesso ao GenBank: ¹gi15213861gbAAK92203.1, ²gi|9049989gbAAF82580.1, ³gi21107417gbAAM36136.1, ⁴gi78035300embCAJ22945.1, ⁵gi3688536embCAA07190.1, ⁶gi77964261gbABB05642.1, ⁷gi71558292gbAAZ37503.1, ⁸gi9950227gbAAG07419.1.

Dentre as proteínas conservadas identificadas, algumas apresentam uma função provável no sistema de secreção do tipo III. HrcC é a proteína formadora do poro da membrana externa e possui, na parte central da proteína, domínios “Secretin N” (número de acesso do SMART PF03958) e “Secretin” (número de acesso do SMART PF00263) identificados por PFAM. O domínio “Secretin N” apresenta uma repetição encontrada em proteínas dos sistemas de secreção II e III, enquanto “Secretin” é um domínio que apresenta uma sequência sinal encontrada em proteínas envolvidas na exportação de exoproteínas. No terminal amino da proteína foi identificado um peptídeo sinal de ancoragem à membrana (GENIN & BOUCHER, 1994).

HrcV de *H. seropedicae* é a proteína formadora do poro da membrana interna e apresenta 4 domínios transmembrana e um peptídeo âncora sinal amino-terminal de 20 aminoácidos (LETUNIC et al., 2006).

Por sua vez HrcN é a ATPase do sistema. Ela apresenta dois domínios um AAA (PFAM) (numero de acesso do SMART SM00382) que pertence à superfamília de ATPases com um P-loop em forma de anel, do grupo de NTPases e um segundo domínio do tipo ATP sintase (número de acesso PF02874) (LETUNIC et al., 2006).

Já HrpL é descrito em *P. syringae* e *Erwinia* spp. como sendo um fator sigma alternativo. Em *H. seropedicae* a análise da proteína homóloga a HrpL mostrou a presença de dois domínios das proteínas da família Sigma 70, r2 (número de acesso SMART PF04542) e r4 (número de acesso SMART PF04545) (Marco Antonio Kadowaki, comunicação pessoal). Em *H. seropedicae*, o primeiro é considerado o mais conservado entre as proteínas sigma 70 e se liga na região -10, já o segundo é responsável pela ligação na região -35 e se encontra menos conservado (CAMPBELL, et al., 2002; MALHOTRA, SEVERINOVA & DARST, 1996).

HrcQ possui um domínio do tipo SpoA (número de acesso do SMART PF01052) que em *Salmonella* está relacionado à capacidade de translocação dos antígenos Ipa, requeridos para a secreção de três proteínas Ipa (CHEN, KANIGA & GALAN, 1996; VENKATESAN, BUYSSE & OAKS, 1992).

HrcR possui um motivo do tipo FliP e provavelmente é uma das proteínas de membrana interna no maquinário de exportação de flagelo. Possivelmente, esta proteína apresenta um papel similar em conjunto com o restante das proteínas localizadas na membrana interna, dentre elas HrcS, HrcR, HrpX, HrcU e HrcJ, no sistema de secreção (HUECK, 1998; ALFANO & COLLMER, 1997)

HrpG possui dois domínios, um domínio Rec (número de acesso do SMART SM00448) e outro domínio carboxi terminal de proteína reguladora de transcrição (número de acesso do PFAM PF00486). O domínio Rec é comum em proteínas que fazem parte de sistema de transdução de sinais de dois componentes, onde o regulador de resposta é fosforilado por uma proteína sensora de membrana para alterar respostas celulares (STOCK, ROBINSON & GOUDREAU, 2000). Já o domínio carbóxi terminal é normalmente conservado

entre reguladores de resposta e é uma variação do motivo de ligação ao DNA do tipo hélice-volta-hélice (MARTINEZ-HACKERT & STOCK, 1997).

4.1.2 Análise comparativa da organização dos genes presentes no “cluster” *hrp* de *H. seropedicae* e outras bactérias

O “cluster” *hrp* é encontrado no cromossomo da maioria dos microrganismos que os possuem, exceto em *R. solanacearum*, onde os genes *hrp* encontram-se em um megaplasmídeo de aproximadamente 200 Kb (BOUCHER et al., 1986; HUANG, et al., 1995; KIM, WEI & BEER, 1997; WENGELNIK, VAN DEN ACKERVEKEN, 1996, HUECK, 1998). A análise comparativa desta região de *H. seropedicae* e de outros organismos mostra que a organização dos genes e operons é parcialmente conservada (Figuras 4 A, B e C). A comparação foi realizada com o “cluster” *hrp* encontrado em patógenos animais, fitopatógenos e microrganismos simbiotes.

Podemos observar que os grupos de genes mantêm a mesma ordem em alguns operons no “cluster” *hrp* de bactérias diferentes, o que pode apontar indícios que em *H. seopedicae* estes genes formem também uma unidade de transcrição. O grupo de genes *hrcUhrpXhrcShrcRhrcQ* é bem conservado entre o *H. seropedicae* e fitopatógenos com sistema de secreção do tipo III do grupo I (*P. syringae* e *Erwinia* sp.). Aparentemente formam um operon, porém apresentam genes diferentes na extremidade deste consenso. Outro grupo de genes conservado entre estes microrganismos é *hrpEhrpDhrcJhrpB*. Outra semelhança com este grupo de fitopatógenos é a presença de *hrpL*, também encontrado em *H. seropedicae*, que não possui características patogênicas.

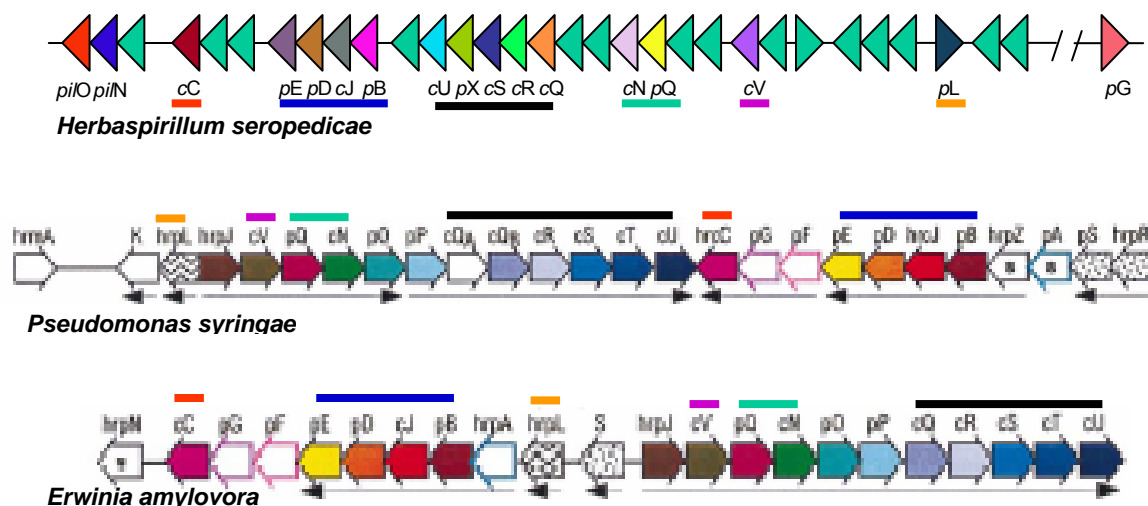


FIGURA 4 A: COMPARAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES *hrp/hrc* DE *H. seropedicae*, *P. syringae* e *E. amylovora*. As barras coloridas indicam a localização de alguns genes presentes nos três organismos.

FONTE: HUECK, C. J. **Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants**. Microbiol. and Molecular Biol. Rev., v. 62, p. 379-433, 1998.

Em relação aos fitopatógenos com sistema de secreção do tipo III do grupo II (*Xanthomonas* spp. e *Ralstonia solanacearum*), a semelhança na organização dos genes é menor. A maior semelhança é principalmente a presença de *hrpG*.

A semelhança da organização dos genes também pode ser observada quando comparamos o “cluster” de *H. seropedicae* com o de patógenos animais, (*Yersinia* spp.) e com bactérias simbiotes (*Rhizobium* spp.). Neste caso, observou-se uma maior semelhança com *Yersinia* do que com *Rhizobium*. Porém *Rhizobium* spp. apresenta *hrpG* como componente regulatório da transcrição dos genes do “cluster”, enquanto que este gene não foi identificado em *Yersinia*.

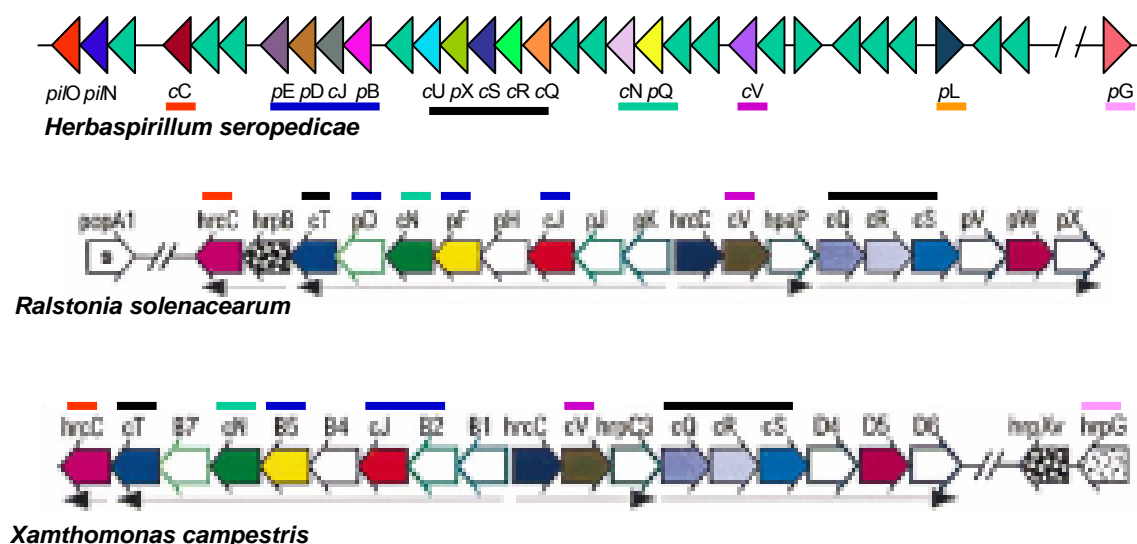


FIGURA 4 B: COMPARAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES *hrp/hrc* DE *H. seropedicae*, *R. solanacearum* E *X. campestris*. As barras coloridas indicam a localização de alguns genes presentes nos três organismos.

FONTE: HUECK, C. J. **Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants**. Microbiol. and Molecular Biol. Rev., v. 62, p. 379-433, 1998.

H. seropedicae possui dois genes *hrp* que codificam para possíveis reguladores de transcrição, HrpL e HrpG. Estas proteínas podem ser as responsáveis pelo controle transcricional de toda ilha de patogenicidade nesta bactéria, indicando uma mistura da regulação observada para os grupos I e II do sistema de secreção tipo III de fitopatógenos (ALFANO & COLLMER, 1996). A presença destas duas proteínas também pode sugerir que este “cluster” tenha sido adquirido através de transferência horizontal múltipla.

Considerando todos os microrganismos comparados, foi observado que o grupamento de genes *hrcR-hrcS-hrcQ* possuiu uma ordem inalterada. Isso mostra que em *H. seropedicae* estes genes provavelmente fazem parte de um operon, a semelhança do que acontece nos outros microrganismos, porém havendo a possibilidade de variação de posição de outros genes que façam parte desta unidade de transcrição.

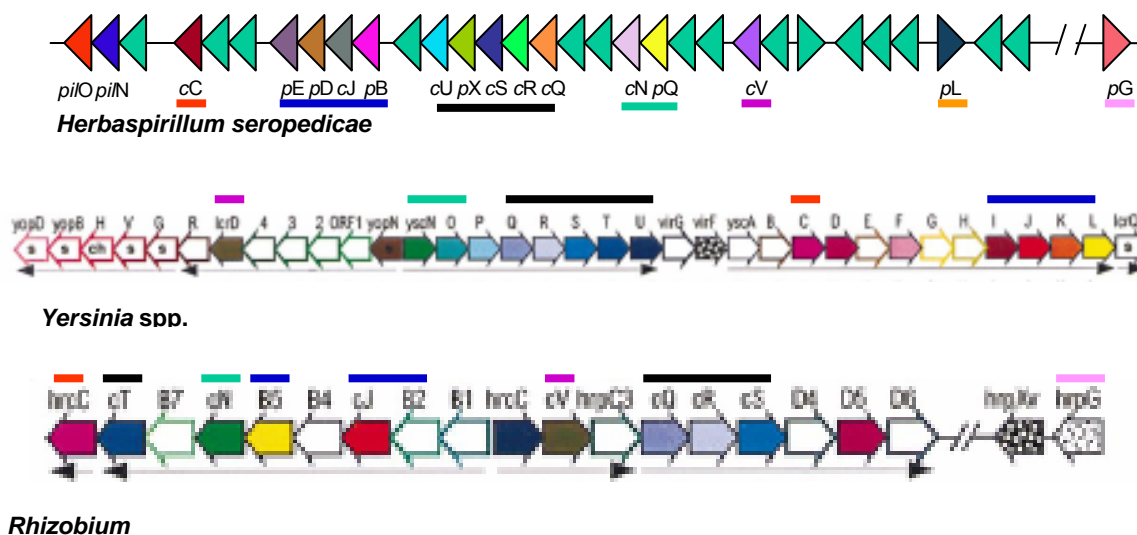


FIGURA 4 C: COMPARAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES *hrp/hrc* DE *H. seropedicae*, *Yersinia* spp. E *Rhizobium* spp. As barras coloridas indicam a localização de alguns genes presentes nos três organismos.

FONTE: HUECK, C. J. **Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants**. Microbiol. and Molecular Biol. Rev., v. 62, p. 379-433, 1998.

A comparação dos “clusters” *hrp/hrc* dos diversos microrganismos com o presente em *H. seropedicae* indica a presença de vários genes em comum, mas uma pouco conservada. Cada microrganismo comparado possui alguns pedaços de unidades de transcrição semelhantes, porém não é o suficiente para dizer que existe uma homologia na organização do “cluster”.

Em *H. seropedicae* podemos observar a presença de dois genes que provavelmente são responsáveis pela regulação do sistema *hrp/hrc* presente, *hrpL* e *hrpG*. O que mostra que sua regulação é provavelmente uma mistura, da regulação dos fitopatógenos com sistema de secreção do tipo III do grupo I e II.

4.2 ANÁLISE DOS GENES *hrcV*, *hrcC* e *hrpG* de *Herbaspirillum seropedicae*

O sistema de secreção do tipo III possui importância já comprovada na interação entre bactérias e hospedeiros, sejam animais ou vegetais (GALÁN & COLLMER, 1999; HUECK, 1998; CORNELIS & VAN GIJSEGEN, 2000). A principal função deste sistema está na comunicação bactéria-hospedeiro, sendo responsável pela secreção de proteínas efetoras nas células eucarióticas. Em *H. seropediceae* a função do sistema de secreção tipo III é

ainda desconhecida, mas acredita-se possuir uma função similar aos já descritos, devido à presença de genes similares na região genômica descrita acima. Dentre os diversos genes presentes no “cluster” *hrp* de *H. seropedicae*, foram escolhidos três genes para este trabalho: os genes *hrcV*, *hrcC* e *hrpG*. Devido a sua importância na composição da estrutura do Sistema de Secreção do Tipo III (*hrcC* e *hrcV*) e na regulação da expressão das proteínas tanto que compõe o sistema como as secretadas (*hrpG*).

4.2.1 Análise parcial do gene *hrcV*

O gene *hrcV* em *H. seropedicae* possui 2085 pb e codifica para uma proteína de 695 aminoácidos, com uma massa molecular calculada de 76,3 kDa. Em fitopatógenos a proteína HrcV se localiza na membrana interna, compondo o sistema de secreção. HrcV é homóloga a LcrD, proteína do sistema de secreção do tipo III de *Yersinia* spp., que é responsável pela formação do poro da membrana interna e juntamente com várias outras proteínas Hrp/Hrc compõe o “core” interno do sistema (BÜTTNER & BONAS, 2002; HUECK, 1998). A fim de verificar o papel desta proteína no processo de secreção do tipo III em *H. seropedicae*, foi obtido um mutante para este gene.

4.2.1.1 Obtenção do mutante *hrcV*⁻ DE *H. seropedicae*

Para a obtenção do mutante *hrcV* de *H. seropedicae*, foi utilizado um plasmídeo contendo parte do gene *hrcV* obtido a partir do banco genômico do Programa GENOPAR. Este fragmento do gene foi transferido para o vetor suicida pSUP220 e mutado pela inserção de um cassete de tetraciclina na posição 511 do gene, resultando no plasmídeo *phrcVTc* (Figura 5). A posição exata do cassete foi determinada por seqüenciamento, utilizando os “primers” nas pontas do “transposon”. Este plasmídeo (*phrcVTc*) foi introduzido na estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1 por conjugação conforme descrito em Materiais e Métodos para obtenção do mutante cromossomal. Foram selecionadas as colônias que sofreram recombinação homóloga dupla, através da resistência a tetraciclina e da perda da resistência a cloranfenicol. Dos transconjugantes que sofreram a recombinação homóloga-dupla, um foi

selecionado, denominado ASD1 e analisado para confirmação da mutação por hibridização de DNA.

O resultado da hibridização de DNA da estirpe selvagem SmR1 e da mutante *hrcV* (ASD1) é apresentada na Figura 6. Duas enzimas foram utilizadas para análise: *Sall* e *SacI*. Com a digestão do DNA do mutante e da estirpe selvagem com *SacI*, o selvagem apresenta uma banda de aproximadamente 2,6 kb e o mutante uma banda de aproximadamente 4,3 kb. Este aumento corresponde ao tamanho do cassete inserido que confere a resistência a tetraciclina. Já se utilizando a enzima *Sall*, o selvagem apresenta uma banda de aproximadamente 3 kb e o mutante uma banda de aproximadamente 2,7 kb e outras duas menores com 1.000 e 819 pb. A diminuição de tamanho da banda maior e o aparecimento das duas bandas menores é devido a presença de outros dois sítios de restrição *Sall* dentro do cassete de tetraciclina. Por essas modificações do tamanho dos fragmentos hibridizados no mutante ASD1, a inserção do cassete de resistência a tetraciclina ocorreu no gene *hrcV*. Este mutante foi utilizado para análise da capacidade de invasão e colonização de plantas de milho.

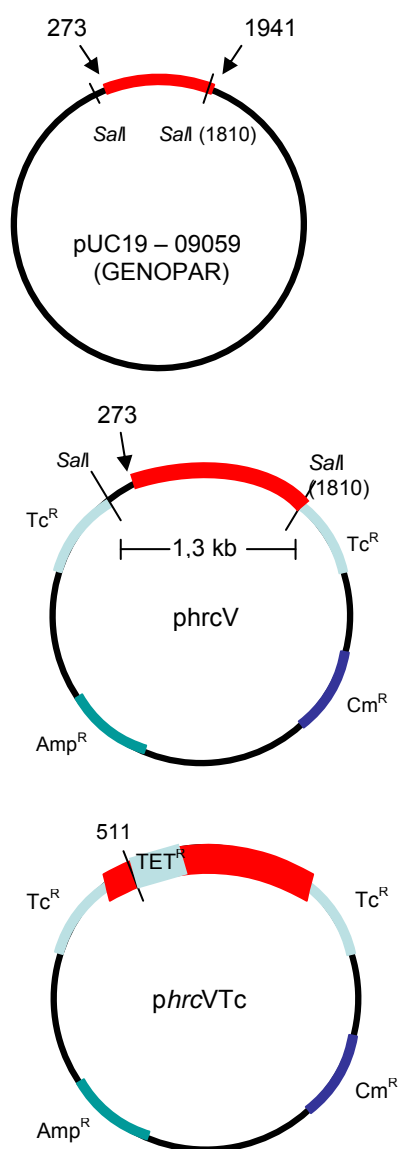


FIGURA 5: ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO *phrcVTc*. A – Clone do programa GENOPAR. Em vermelho o fragmento do gene *hrcV* e indicado por setas as posições de início e fim do gene no clone. As posições dos sítios de restrição *SalI* utilizados para digestão estão indicados. B – *phrcV*, em vermelho o fragmento do gene *hrcV* com indicações das posições de início e fim, tamanho do fragmento clonado e posições dos sítios de restrição utilizadas. C – *phrcVTc*, indicando, em azul, a posição (do gene) de entrada do transposon TET-1.

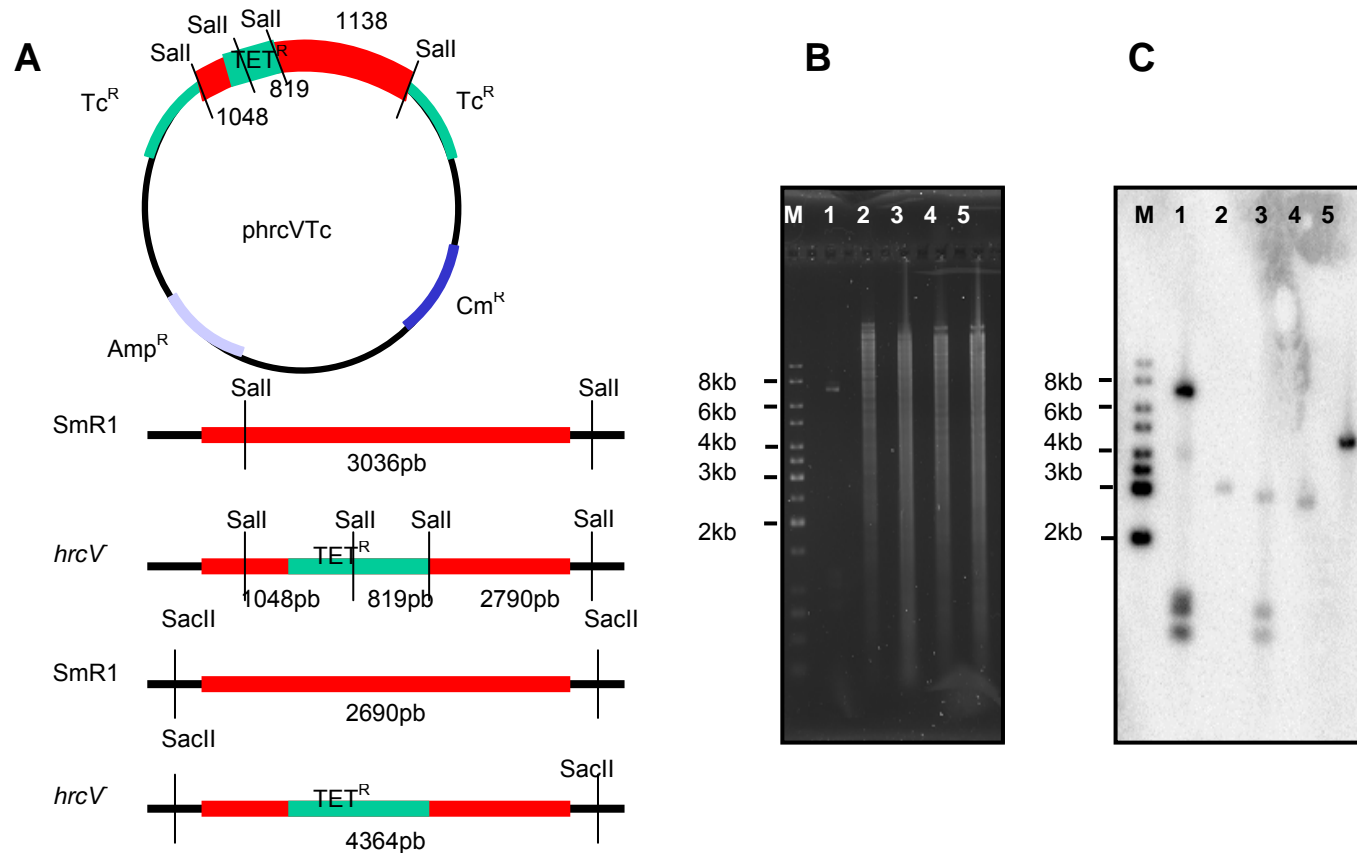


FIGURA 6: ANÁLISE DO MUTANTE *hrcV* DE *H. seropedicae*. A – esquema dos tamanhos dos fragmentos após restrição com as enzimas *Sall* e *SacII*. B – Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico de *H. seropedicae* estirpes selvagem *SmR1* (linhas 2 e 4) e mutante *ASD1* (linhas 3 e 5). O DNA genômico das estirpes foi digerido com as enzimas *Sall* (linhas 2 e 3) ou *SacII* (linhas 4 e 5). A linha 1 contém o plasmídeo *phrcVTc* digerido com *Sall*. M indica o marcador de tamanho molecular em kb. O gel foi corado com brometo de etídeo. C – Hibridização após transferência do gel apresentado em B. O plasmídeo *phrcVTc* digerido com *Sall* foi utilizado como sonda. A imagem foi obtida utilizando o equipamento Storm Densitometer (Amersham Pharmacia Biotech).

A função do sistema *hrp* em fitopatógenos, patógenos humanos e em microrganismos simbiotes é parcialmente conhecida (BÜTTNER & BONAS, 2002; HUECK, 1998; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000; GALÁN & COLLMER, 1999; PÜHLER et al., 2004). Entretanto, em microrganismos endofíticos associativos, como o *H. seropedicae*, a sua função e regulação não foram ainda comprovadas. Muito embora genes similares aos descritos em outros organismos estejam presentes, não se sabe se o sistema de secreção do tipo III é funcional em *H. seropedicae*. Isto tem repercussão direta na dificuldade de se aplicar métodos de caracterização fisiológica de mutantes nos genes *hrp/hrc* de *H. seropedicae*.

Considerando que o sistema de secreção do tipo III tem sido caracterizado, em outros organismos, como envolvido no processo de infecção e colonização do hospedeiro, foram realizados ensaios em plantas para verificar um possível fenótipo para o mutante *hrcV* de *H. seropedicae*. O ensaio utilizado foi a inoculação de raízes de milho com a estirpe selvagem e a mutante para posterior recuperação e contagem de células. Até o momento, nenhum resultado satisfatório foi obtido. Dificuldades experimentais incluíram o crescimento de colônias bacterianas nos controles negativos e ineficiência na esterilização externa das sementes.

4.2.2 Análise parcial do gene *hrcC*

Outro gene analisado durante este projeto foi o gene *hrcC*. O produto deste gene, a proteína HrcC está envolvida na formação do poro de membrana externa do sistema de secreção do tipo III. É uma proteína com alta similaridade com PulD, proteína que possui função semelhante dentro do sistema de secreção do tipo II. HrcC provavelmente forma um complexo multimérico em forma de anel na membrana externa (DENG & HUANG, 1999).

Para análise do gene *hrcC*, foi construído um plasmídeo suicida para a obtenção de um mutante cromossomal de *H. seropedicae*. A análise de expressão do gene *hrcC* foi feita utilizando-se uma fusão transcricional com o gene *lacZ*.

4.2.2.1 Construção do plasmídeo *phrcCTc* para a obtenção de mutante

Em *P. syringae*, a mutação de HrcC resulta em acúmulo das proteínas secretadas no periplasma, indicando que o transporte pelas membranas interna e externa é independente (HUECK, 1998; CHARKOWISKI *et al.*, 1997). HrcC é responsável pela função de poro da membrana externa. Desta forma a obtenção de um mutante *hrcC* de *H. seropedicae* ajudaria a identificar as proteínas secretadas por este sistema.

O fragmento do gene *hrcC* utilizado foi retirado de um clone do programa GENOPAR e inserido no plasmídeo suicida pSUP220. Posteriormente foi mutado com a inserção de um cassete de tetraciclina por reação de “transposon”. A reação foi transformada em *E. coli* estirpe DH10B. As colônias transformantes foram selecionadas por resistência a tetraciclina. Posteriormente, os plasmídeos dos clones resistentes foram analisados por restrição e a localização exata de entrada do cassete de tetraciclina foi determinada por seqüenciamento, utilizando os “primers” nas pontas do “transposon”. O plasmídeo resultante, denominado de *phrcCTc* (Figura 7) possui o cassete de tetraciclina na posição 472 do gene.

Futuramente o plasmídeo *phrcCTc* poderá ser conjugado em *H. seropedicae* estirpe selvagem SmR1 para a obtenção de mutantes do gene *hrcC*. Conforme descrito em Materiais e Métodos foi utilizado um fragmento do gene, de modo que o mutante poderá ser obtido tanto por recombinação homóloga simples quanto dupla.

A obtenção deste mutante será importante para auxiliar na caracterização da função deste gene dentro do sistema *hrp/hrc* e na caracterização da importância deste sistema na interação do *H. seropedicae* com as plantas.

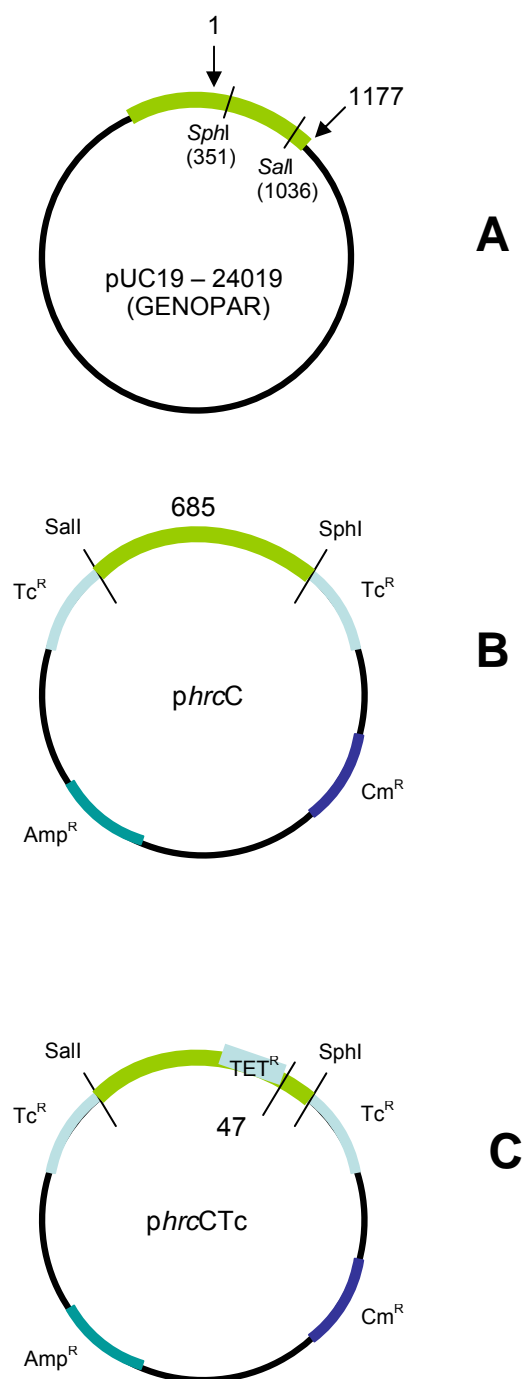


FIGURA 7: ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO *phrcCTc*. A – Clone do programa GENOPAR. Em verde o fragmento do gene *hrcC* e indicado por setas as posições de início e fim do gene no clone. As posições dos sítios de restrição *Sall* e *SphI* utilizados para digestão estão indicados. B – *phrcC*, em verde o fragmento do gene *hrcC* com o tamanho do fragmento clonado e posições das enzimas de restrição utilizadas. C – *phrcCTc*, indicando a posição (do gene) de entrada do transposon TET-1.

4.2.2.2 Análise da expressão da fusão *hrcC::lacZ*

Conforme já descrito para fitopatógenos, os genes que compõem o Sistema de Secreção tipo III apresentam expressão dependente de contato físico com a célula eucariótica, da composição do meio, ou ainda, de características físicas específicas (XIAO et al., 1992; HUECK, 1998). Foi descrito também que a expressão destes genes pode ser dependente da fonte e concentração de carbono e nitrogênio, osmolaridade e pH do meio e ainda da temperatura do ensaio (XIAO et al., 1992; WEI, SNEATH & BEER, 1992; RAHME, MINDRINOS & PANOPOULOS, 1992). Ensaio realizados com bactérias simbiotes indicam que a transcrição é dependente de compostos fenólicos liberados pela planta durante o processo de nodulação (VIPREY et al., 1998).

No entanto, no caso de fitopatógeno, não há um consenso quanto a quais fatores que estimulam e quais são repressores da expressão dos genes *hrp*, ocorrendo variações entre os microrganismos (XIAO, 1992; RAHME, 1992; WEI, 1992; HUYNH, 1989; TSUGE, 2002; KNOOP, STASKAVICZ & BONAS, 1991). Em ambos os casos, as respostas também são dependentes da combinação bactéria-planta hospedeira.

O gene *hrcC* de *H. seropedicae* possui 2118 pb e codifica uma proteína de 706 aminoácidos. Este gene está localizado no final do “cluster” *hrp*, a montante dos genes *pilN* e *pilO*. A montante do gene *hrcC* estão duas prováveis *orfs* cujos produtos apresentam função desconhecida e o gene *hrpE*. A região entre *hrcC* e *hrpE* compreende 775 pb e foi utilizada 521 pb a montante de *hrcC* para a análise de atividade promotora de *hrcC* (Figura 8).

Esta região foi analisada quanto à presença de seqüências promotoras. Foram pesquisadas seqüências do tipo -10/-35 (sigma 70) e -12/-24 (sigma 54). Ainda foram pesquisadas seqüências consenso denominadas de “*hrp box*”, encontradas em *P. syringae* e *Erwinia* sp. e também seqüências consenso denominadas de “*PIP box*”, encontradas em *X. campestris* e *R. solanacearum* (XIAO & HUTCHESON, 1994; KNOOP, STASKAWICZ & BONAS, 1991). Embora nenhuma seqüência consenso conhecida tenha sido encontrada na região pesquisada, não se pode afirmar a inexistência de promotor na região. Há uma grande variação de promotores nos diferentes tipos de sistema de

secreção (TSUGE et al., 2002; PÜHLER et al., 2004). Além disso, *H. seropedicae* apresenta características diferentes dos grupos estudados de patógenos animais, fitopatógenos ou bactérias simbiotes.

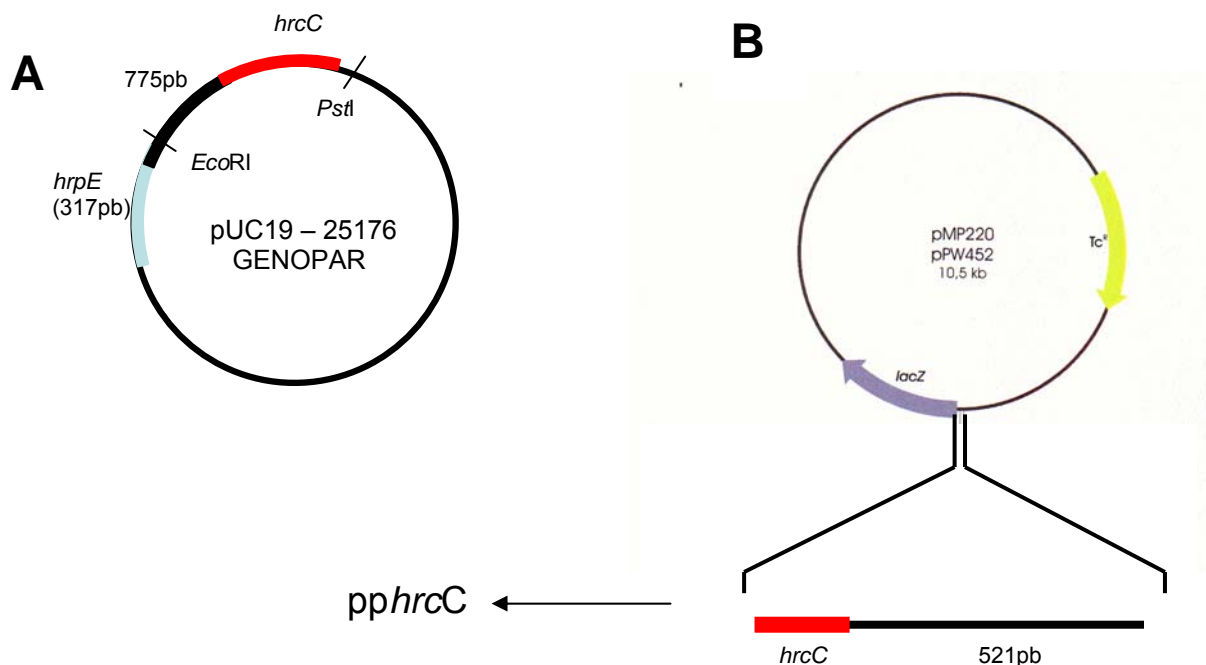


FIGURA 8: ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO ppHrcC. A – Clone do programa GENOPAR. Em vermelho o fragmento do gene *hrcC* e em azul o fragmento do gene *hrpE*. Estão indicados o tamanho da região intergênica e as posições das enzimas de restrição utilizadas para a clonagem. B – ppHrcC, com indicação do sentido de clonagem e tamanho da região promotora.

Em vista da ausência de uma sequência promotora definida, a região que compreende 521bp a montante do início de tradução do gene *hrcC* foi clonada a montante do gene *lacZ* no vetor pMP220 (ver Material e Métodos 3.16). Nesta construção, o gene *lacZ* não apresenta sequência promotora e, portanto, a atividade de β -galactosidade observada é devido a atividade da sequência promotora clonada.

Os ensaios de expressão da fusão *hrcC::lacZ* foram conduzidos variando-se três fontes de carbono (citrato, succinato e malato), concentração de nitrogênio (2 e 20 mmol/l) e fosfatos (baixo fosfato: um décimo da concentração normalmente utilizada no crescimento da bactéria; ou alto

fosfato: concentração usual de crescimento). Os resultados são apresentados na tabela 8.

Foi observado aumento da expressão de *hrcC::lacZ* somente na presença de succinato como fonte de carbono, 20 mmol/L de cloreto de amônio e baixa concentração de fosfatos. O aumento da expressão dos genes *hrp/hrc* dependente da fonte de carbono no meio é descrito para vários fitopatógenos (XIAO et al., 1992; WEI, SNEATH & BEER, 1992; RAHME, MINDRINOS & PANOPOULOS, 1992; HUYNH, DAHLBECK & STASKAWICZ, 1989; INNES et al., 1993), porém não existe uma razão descrita para este aumento. Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* os genes *hrp/hrc* possuem sua expressão aumentada em meio de cultura com sacarose (WENGELNIK, et al., 1996). Já em *X. oryzae* pv. *oryzae* a expressão é aumentada em meio de cultura contendo xilose (TSUGE, 2002). Em *P. syringae* pv. *glycinea* foi demonstrado que ácidos dicarboxílicos, como o succinato, reprimem a expressão dos genes das proteínas secretadas pelo sistema *hrp*, sendo que em *P. syringae* pv. *syringae* 61, glicerol e succinato são tão efetivos no estímulo da expressão quanto manitol (XIAO, 1992; HUYNH, 1989). Yucel et al. (1989) e Xiao et al. (1992) sugeriram que as condições nutricionais afetam a expressão dos genes *hrp/hrc* durante o estágio de indução da reação de hipersensibilidade, ou seja, durante o estágio inicial de interação entre a bactéria e a planta.

O aumento da concentração da fonte de nitrogênio com cloreto de amônio ou a mudança da fonte não parece estar envolvido na ativação da fusão *pphrcC* em *H. seropedicae*. Isso também já foi demonstrado para *P. syringae* pv. *syringae* 61 por Xiao e colaboradores (1992). Enquanto que para *E. amylovora* foi demonstrado que o aumento da fonte de nitrogênio (tanto sulfato quanto cloreto de amônio) reprime a expressão dos genes do “cluster” *hrp* (WEI, 1992).

TABELA 9: EFEITO DA FONTE DE CARBONO, CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO E FOSFATO NA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE DA FUSÃO *hrcC::lacZ*.

Condição	NH ₄ Cl 20mmol/L Alto Fosfato			NH ₄ Cl 20mmol/L Baixo Fosfato		
Fonte de Carbono	Malato	Succinato	Citrato	Malato	Succinato	Citrato
SmR1	9±4	3±3	4±1	11±2	5±3	7±2
SmR1 + pMP	223±9	187±17	177±2	66±9	44±3	52±3
SmR1 + pp <i>hrcC</i>	155±6	254±24	141±8	27±5	530±91	30±6

Condição	NH ₄ Cl 2mmol/L Alto Fosfato			NH ₄ Cl 2mmol/L Baixo Fosfato		
Fonte de Carbono	Malato	Succinato	Citrato	Malato	Succinato	Citrato
SmR1	2±1	0	4±1	5±2	0	16±7
SmR1 + pMP	160±23	102±9	92±6	115±18	92±3	65±11
SmR1 + pp <i>hrcC</i>	132±24	160±16	77±10	141±7	112±10	51±6

Condição	Glutamato 5mmol/L Alto Fosfato			Glutamato 5mmol/L Bixo Fosfato		
Fonte de Carbono	Malato	Succinato	Citrato	Malato	Succinato	Citrato
SmR1	2±1	0	6±1	0	1±1	2±1
SmR1 + pMP	334±55	211±26	218±31	111±22	111±8	80±12
SmR1 + pp <i>hrcC</i>	201±33	168±15	151±3	96±4	79±3	66±6

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos em *H. seropedicae* estirpe selvagem SmR1 na ausência de plasmídeo ou na presença do plasmídeo controle pMP220 ou da fusão *hrcC::lacZ* (pp*hrcC*). A atividade é apresentada em nmol de o-nitrofenol/mg de proteína/min. Os resultados representam a média de 3 determinações independentes \pm desvio padrão.

O ensaio de expressão da fusão *hrcC::lacZ* também foi realizado em meio mínimo M9, um meio de baixa osmolaridade e baixa concentração de nutrientes (SAMBROOK et al., 1989). Segundo Rahme et al. (1992) o meio M9 em pH 5,5 apresenta condições semelhantes ao encontrado em apoplasto de plantas, devido às características hipo-osmótica e de concentração limitante de nutrientes. Estas características são encontradas durante a resposta imune da planta a invasores, que em fitopatógenos leva a repressão dos genes *hrp*.

O resultado obtido é apresentado na tabela 9. Não foi observada atividade de expressão da fusão *hrcC::lacZ* diferente do basal. Este resultado pode sugerir que a expressão de *hrcC* não é ativada em baixo pH e condição de hipo-osmolaridade. Considerando que as condições acima são semelhantes ao que ocorre na resposta imune e que *H. seropediceae* não é fitopatogênica e sim uma bactéria endofítica, não causando uma resposta imune na planta, o resultado negativo pode ser explicado (RAHME, MINDRINOS & PANOPOULOS, 1992; KNOOP, STASKAWICZ & BONAS, 1991; SCHULTE & BONAS, 1992).

TABELA 10: ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE DA FUSÃO *hrcC::lacZ* EM MEIO MÍNIMO M9.

SmR1	2 \pm 1
SmR1 + pMP	97 \pm 7
SmR1 + pphrcC	74 \pm 5

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos em *H. seropediceae* estirpe selvagem SmR1 na ausência de plasmídeo ou na presença do plasmídeo controle pMP220 ou da fusão *hrcC::lacZ* (pphrcC). A atividade é apresentada em nmol de o-nitrofenol/mg de proteína/min. Os resultados representam a média de 3 determinações independentes \pm desvio padrão.

Sabendo-se que a expressão dos genes do sistema de secreção do tipo III de fitopatógenos é dependente do contato com a planta (XIAO et al., 1992; HUECK, 1998), foi testada a atividade da fusão *hrcC::lacZ* em bactérias inoculadas em milho (*Zea mays*). A atividade foi determinada em duas

situações principais, a atividade da cultura em contato com a raiz de milho e atividade das bactérias aderidas a raiz após incubação em cultura.

A atividade da cultura em contato com a raiz de milho foi determinada de três maneiras. A raiz diretamente na cultura e, devido a atividade de β -galactosidase presente em plantas, o experimento também foi feito com a raiz dentro de um saco de diálise ou fragmentos da raiz emblocados em agarose 1%. A atividade foi determinada antes de colocar a raiz em contato com a cultura e após 1, 3 e 5 horas de contato (Materiais e Métodos 3.18).

Não houve grande variação da atividade de fusão *hrcC::lacZ* em nenhum dos casos descritos acima, nem mesmo quando a raiz estava diretamente em contato com a cultura. Um resultado diferente do esperado, já que é comprovada a atividade de β -galactosidase em plantas. Porém, esta ausência de ativação da fusão, pode significar que o passo inicial para a associação do *H. seropedicae* e a planta seja a adesão às raízes e posteriormente aconteça a entrada. Supondo que as proteínas Hrp/Hrc sejam necessárias para a entrada na planta a ativação da fusão não poderia ser vista na cultura, mas sim nas bactérias aderidas a raiz.

Para a medida da atividade da fusão *hrcC::lacZ* das bactérias aderidas a raiz, as sementes de milho (*Zea mays*) germinadas foram incubadas em cultura. Após os tempos de 1,5, 3,5 e 20 horas as plântulas foram retiradas da cultura e tiveram as raízes destacadas. As raízes foram colocadas em 1 mL de meio NFbHP-malato e sonicadas para o desprendimento das bactérias aderidas (ver Materiais e Métodos 3.18.2).

A atividade medida foi muito baixa, principalmente devido a pequena quantidade de bactérias que se desprenderam da raiz. Com isso não se pode dizer que não há a ativação dos genes *hrp/hrc* com o contato, mas sim que a sonicação não foi eficaz na retirada das bactérias aderidas à raiz. Outro fator pode ser que os tempos usados foram inadequados, necessitando de tempos maiores para que haja uma maior quantidade de bactérias aderidas.

A fusão *hrcC::lacZ* foi testada em várias condições diferentes, porém nenhuma apresentou uma expressão muito alta. Utilizando-se NFbHP-succinato com alta concentração de amônia e um décimo da concentração de fosfatos, os níveis de expressão da fusão foram um pouco mais altos que o

restante. Contudo não condiz com uma condição ideal para a expressão dos genes *hrp/hrc*.

Estas condições ideais ainda não foram encontradas, havendo a necessidade de testes com outras fontes de carbono e em outros meios. Também há a necessidade de um maior aprimoramento das metodologias para se testar a expressão dependente do contato com plantas. Ou ainda, a região a montante do gene *hrcC*, clonada na fusão, pode não apresentar nenhuma região promotora. Considerando assim que o gene faz parte de um operon e que a região promotora responsável pela expressão de *hrcC* e dos demais genes que fazem parte desta unidade de transcrição está mais a frente no cromossomo.

4.2.3 Análise parcial do gene *hrpG*

O último gene analisado nesta dissertação foi o gene *hrpG*. Este gene está localizado fora do “cluster” *hrp/hrc* de *H. seropedicae*, possui 717 pb e codifica uma proteína com 239 aminoácidos. A proteína resultante faz parte do grupo de reguladores de resposta de sistema de dois componentes, composto por uma proteína sensora, normalmente associada a membrana interna, que fosforila o regulador de resposta, modulando a sua atividade (STOCK, ROBINSON & GOUDREAU, 2000). Em *Ralstonia solanacearum* HrpG é responsável pela integração de diferentes sinais ambientais, sendo necessário para a ativação de *hrpB* na presença de sinais oriundos da planta e estímulos do estado metabólico (GENIN et al., 2005; BRITO et al., 1999). Porém ainda não se conhece a proteína sensora quinase responsável pela ativação (GENIN et al., 2005). Já em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foi identificado um candidato a sensor histidina quinase que interage com HrpG (ALEGRIA et al., 2004).

Foi realizada a construção de uma fusão *hrpG::lacZ* para a análise de expressão do gene e a construção de um plasmídeo suicida para a mutação do gene e obtenção de uma fusão cromossomal *hrpG::lacZ*.

4.2.3.1 Análise da expressão da fusão *hrpG::lacZ*

Conforme descrita anteriormente a expressão dos genes *hrp/hrc* componentes do sistema de secreção do tipo III em fitopatógenos é dependente do contato com células eucarióticas e outras características físico-químicas, como fonte e concentração de carbono e nitrogênio, osmolaridade e pH do meio e ainda da temperatura do ensaio (HUECK, 1998; XIAO et al., 1992; WEI, SNEATH & BEER, 1992; RAHME, MINDRINOS & PANOPOULOS, 1992).

A montante de *hrpG* existe uma *orf* hipotética e o espaço intergênico é de aproximadamente 650 pb. Para a análise da expressão deste gene, foi clonado em vetor de expressão pMP220 um fragmento originado a partir de um clone do programa GENOPAR. Este fragmento contém 938 pb a montante do gene, o gene *hrpG* completo e 65 pb a jusante (Figura 9). O fragmento a jusante não apresenta a característica de formação de gramplos, o que impediria a terminação prematura antes da transcrição do gene *lacZ*.

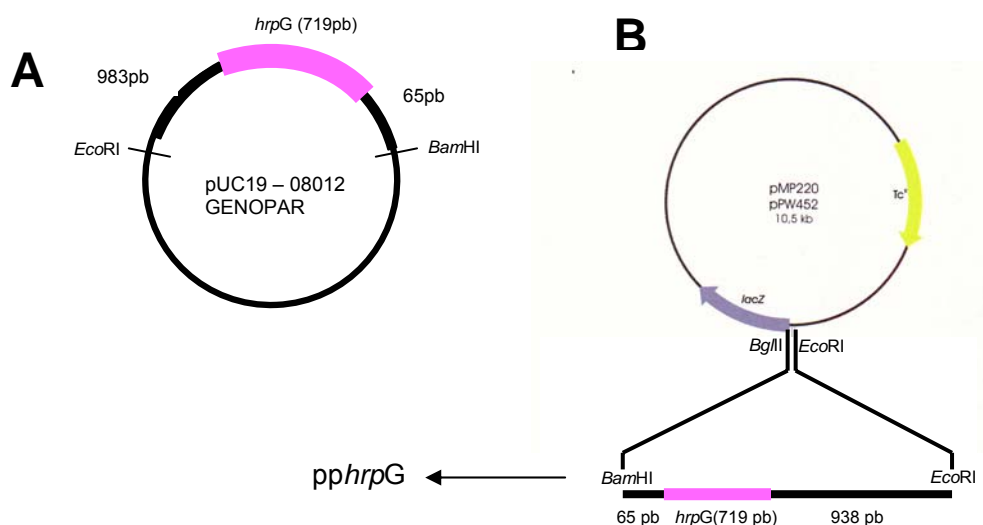


FIGURA 9: ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pphrpG. A – Clone do programa GENOPAR. Em lilás o gene *hrpG*, estão indicados os tamanhos das regiões a montante e a jusante do gene e as posições das enzimas de restrição utilizadas para a clonagem. B – pphrpG, com indicação do sentido de clonagem, tamanho da região promotora e enzimas utilizadas para a liberação do fragmento clonado e digestão do vetor.

Foram analisadas somente duas condições diferentes. Na primeira, o meio continha malato como fonte de carbono, com 20 mmol/L de NH_4Cl e concentração normal de fosfatos, que é a condição normal de crescimento do *H. seropedicae*. Os resultados são apresentados na tabela 10.

Pode-se verificar que nesta condição a expressão da fusão *hrpG::lacZ* se apresentou levemente aumentada, aproximadamente 50%. O que já foi demonstrado em *X. campestris* pv. *vesicatoria*, que possui um nível de expressão basal de *hrpG* mesmo em meios complexos e a expressão é levemente aumentada em meios mínimos em que os genes *hrp/hrc* possuem alta expressão (WANGELNIK, VAN DEN ACKERVEKEN & BONAS, 1996). Já em *R. solanacearum* *hrpG* é constitutivamente expresso, tanto em meios complexos quanto em meios mínimos, sendo que o que determinaria a ativação do restante dos genes do sistema de secreção do tipo III seria a fosforilação pela proteína quinase sensora (BRITO et al., 1999). Porém quando co-cultivado com células de *Arabidopsis* e tomate a expressão de *hrpG* é elevada (BRITO et al., 1999).

TABELA 11: ENSAIO DA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE DA FUSÃO *hrpG::lacZ* EM MEIO NFbHP – MALATO COM 20 mmol/L DE NH_4Cl E CONCENTRAÇÃO NORMAL DA MISTURA DE FOSFATOS.

SmR1	$3 \pm 0,4$
SmR1 + pMP	228 ± 15
SmR1 + pp <i>hrcG</i>	340 ± 36

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos em *H. seropedicae* estirpe selvagem SmR1 na ausência de plasmídeo ou na presença do plasmídeo controle pMP220 ou da fusão *hrpG::lacZ* (pp*hrpG*). A atividade é apresentada em nmol de o-nitrofenol/mg de proteína/min. Os resultados representam a média de 3 determinações independentes \pm desvio padrão.

Na segunda condição de análise foi utilizado o meio com succinato como fonte de carbono, 20 mmol/L de NH_4Cl e um décimo da concentração normal

de fosfatos, condição em que a expressão da fusão *hrcC::lacZ* apresentou um leve aumento. Os resultados estão demonstrados na Tabela 11.

Os resultados mostram que não houve ativação da expressão da fusão testada. Diferente do que ocorreu para a fusão *hrcC::lacZ*, que apresentou um leve aumento. Porém, como já foi citado, em *X. campestris* *hrpG* apresenta expressão constitutiva, que não é alterada em situações em que o restante dos genes *hrc/hrp* apresenta a sua expressão estimulada (BRITO et al., 1999).

TABELA 12: ENSAIO DA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE DA FUSÃO *hrpG::lacZ* EM MEIO NFbHP – SUCCINATO COM 20 mmol/L DE NH_4Cl E UM DÉCIMO DA CONCENTRAÇÃO NORMAL DE FOSFATOS.

SmR1	$4 \pm 0,6$
SmR1 + pMP	90 ± 2
SmR1 + pp <i>hrcG</i>	119 ± 13

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos em *H. seropedicae* estirpe selvagem SmR1 na ausência de plasmídeo ou na presença do plasmídeo controle pMP220 ou da fusão *hrpG::lacZ* (pp*hrpG*). A atividade é apresentada em nmol de o-nitrofenol/mg de proteína/min. Os resultados representam a média de 3 determinações independentes \pm desvio padrão.

Apesar da expressão da fusão *hrpG::lacZ* apresentar um leve aumento em meio NFbHP-Malato com alta concentração de amônio e concentração normal de fosfatos, podemos considerar este nível como basal, por ser muito baixo. Pode ser que *hrpG* possua a expressão semelhante a *X. campestris* como já citado acima, onde em outras condições sua expressão é aumentada (WANGELNIK, VAN DEN ACKERVEKEN & BONAS, 1996), mostrando a necessidade de se testar outras condições de cultivo. Porém, se isso for uma expressão constitutiva baixa, talvez possa ser estimulada na presença da planta, semelhante ao que já foi demonstrado para *R. solanacearum* (BRITO et al., 1999).

4.2.3.2 Construção do plasmídeo *phrpGlacZ*Km para a obtenção da fusão cromossomal *hrpG::lacZ* e mutação do gene *hrpG*.

Um fragmento de *hrpG* foi gerado a partir da digestão de um plasmídeo do banco de clones do programa GENOPAR. Este fragmento foi clonado em vetor suicida pSUP202. O plasmídeo resultante sofreu digestão parcial com *Pst*I para a inserção do cassete Km::*lacZ*, retirado do vetor pKOK6 por digestão com a mesma enzima. As colônias transconjugantes foram selecionadas pela resistência a canamicina e posteriormente foram analisadas por restrição para a verificação da posição e orientação de entrada do cassete. O plasmídeo selecionado possui o cassete no sítio *Pst*I da posição 407 do gene e na orientação *lacZ*::Km. Este plasmídeo recebeu o nome de *phrpGlacZ*::Km e o esquema de sua montagem está na Figura 10. Este plasmídeo foi transformado em *E. coli* stirpe S17.1. A transferência para *H. seropedicae* estirpe SmR1 será feita por conjugação. Devido a utilização de um fragmento do gene, espera-se obter mutantes simples sem a reconstituição do gene.

O mutante com fusão cromossomal com *lacZ* poderá ser utilizado para análise da expressão de *hrpG*, considerando que fusões cromossomais possuem um "background" menor que fusões plasmidiais. Também poderá ser utilizado na caracterização deste gene, que provavelmente é um importante regulador do sistema *hrp/hrc* de *H. seropedicae* e ainda na função deste sistema na interação com plantas.

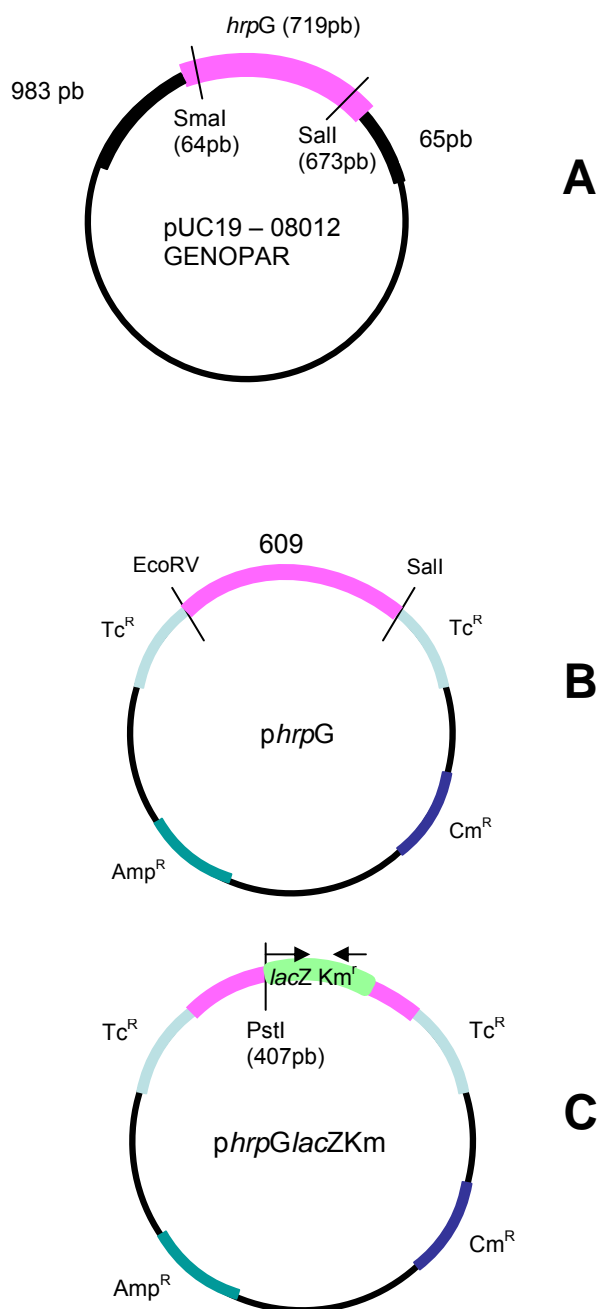


FIGURA 10: ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO *phrpGlacZKm*. A – Clone do programa GENOPAR. Em lilás o fragmento do gene *hrpG*. O tamanho do gene e as posições dos sítios de restrição *Sa*II e *Sma*I utilizados para digestão estão indicados. B – *phrpG*, em lilás o fragmento do gene *hrpG* com o tamanho do fragmento clonado e posições das enzimas de restrição utilizadas. C – *phrpGlacZ::Km*, indicando o sítio *Pst*I e a sua posição no gene, onde ocorreu a inserção do cassete *Km::lacZ* retirado do vetor pKOK6.

5. CONCLUSÃO

Na ilha genômica de *H. seropedicae* encontram-se 31 prováveis genes ou *orfs*. Destes, 14 genes são homólogos aos genes que codificam para proteínas responsáveis pela montagem do sistema de secreção do tipo III de bactérias fitopatogênicas, patógenos humanos e microrganismos simbiontes, 2 genes são homólogos a genes *pil*, do sistema de montagem de pili e as demais são consideradas *orfs* hipotéticas conservadas.

Esta região de 28 kb possui um conteúdo de C+G de aproximadamente 65%, semelhante ao restante do genoma, e não apresenta elementos de transposição e nem genes que codifiquem para tRNA.

Em *H. seropedicae* estão presentes nesta região dois genes que codificam para prováveis proteínas reguladoras, *hrpL* e *hrpG*. Mostrando uma provável regulação híbrida, da regulação encontrada nos fitopatógenos com sistema de secreção do tipo III do grupo I e II.

O mutante ASD1 de *H. seropedicae* (*hrcV*) foi obtido. Análises fisiológicas preliminares não indicaram fenótipo característico para este mutante.

As análises de fusão com o gene *lacZ* das regiões a montante dos genes *hrcC* e *hrpG*, demonstraram que ainda não foram obtidas as condições ideais para a expressão *in vitro* dos genes *hrp/hrc* presentes em *H. seropedicae*.

Com a fusão plasmidial *hrcC::lacZ* foram obtidos resultados preliminares que sugerem aumento de expressão na presença de succinato e baixa concentração de fosfato.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDON, D. et al., **A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes.** EMBO J, Oxford, v. 19, p. 2304-2314, 2000.
- ANDERSON, D. M.; SCHNEEWIND, O. **A mRNA signal for the Type III Secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*.** Science, Washington, v. 278, p. 1140-1143, 1997.
- ANDERSON, D. M.; SCHNEEWIND, O. **Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more.** Curr. Opin. Microbiol., Oxford, v. 2, p. 18-24, 1999.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. **Bacterial pathogens in plants: life up against the wall.** Plant Cell, Rockville, v. 8, p. 1683-1698, 1996.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. **The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death.** J. Bacteriol., Washington, v. 179, p. 5655-5662, 1997.
- ALEGRIA, M. C. et al. **New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the pathogen *Xanthomonas axonodopis* pathovar *citri*.** J. Bacteriol., Washington, v. 186: 6186-6197, 2004.
- BALDANI, J. I. et al. **Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium.** Intl. J. Sys. Bact., v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D. et al. **Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*.** Symbiosis, Philadelphia, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. **Selection of *Herbaspirillum seropedicae* spp. strains associated with rice seedlings amended with ¹⁵N-labelled fertilise.** In: International symposium on sustainable agriculture for the tropics – the role of biological nitrogen fixation (1995: Angra dos Reis). **Resumos...** Angra dos Reis: EMBRAPA, p.202-203, 1995.
- BANKIER, A. T.; WESTON, K. M.; BARREL, B. G. **Random cloning and sequencing by the M13/dideoxynucleotide chain termination method.** Meth. Enzymol., New York, v. 155, p. 51-93, 1987.
- BODDEY, R. M. et al. **Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement.** Plant Soil, The Hague, v. 174, p. 195-209, 1995.

BOGDANOVE, A. J. *et al.* **Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria.** Mol. Microbiol., Salem, v. 20, p. 681-683, 1996.

BOUCHER, C. A. *et al.* **Virulence genes are carried by a megaplasmid of the pathogen *Pseudomonas solenacearum*.** Mol. Gen. Genet., New York, v. 205, p. 270-275, 1986.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem., New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, B. *et al.* ***prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solenacearum*.** EMBO J., Oxford, v. 31: 237-251, 1999.

BRITO, B. *et al.* **A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solenacearum hrp* genes.** Mol. Plant-Microbe Interact., Saint Paul, v. 15, p. 109-119, 2002.

BURNS, R. C.; HARDY, R. W. F. **Nitrogen fixation in bacteria and higher plants.** Berlin: Springer-Verlag, 1975.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. **Getting across – bacteria type III effector proteins on their way to the plant cell.** EMBO J., Oxford, v. 21, p. 5313-5322, 2002.

CAMPBELL, E. A. *et al.* **Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit.** Mol Cell., Cambridge, 2002 Mar;9(3):527-39.

CHANG, J. H. *et al.* **Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria.** Curr. Opin. Microbiol., Oxford, v. 7, p. 11-18, 2004.

CHARKOWSKI, A. O.; HUANG, H. C.; COLLMER, A. **Altered location of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrp* mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of Gram-negative bacteria.** J. Bacteriol., Washington, v. 179, p. 3866-3874, 1997.

CHEETHAM; B. F.; KATZ, M. E. **A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants.** Mol. Microbiol., Salem, v. 18, p. 201-208, 1995

CHEN, L. M.; KANIGA, K.; GALAN, J. E. ***Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages.** Mol Microbiol., Salem, Sep; 21(5):1101-15, 1996.

COG ("Cluster of Orthologous Groups of Proteins"). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>.

CORNELIS, G. R.; VAN GIJSEGEN, F. **Assembly and function of type III secretory systems.** Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto, v. 54, p. 735-774, 2000

CRUZ, L. M. et al. **16S Ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill).** App. Environ. Microbiol., Washington, v. 67, p. 2375–2379, 2001.

DELAHAY, R. M. et al. **The coiled-coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion translocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli*.** J. Biol. Chem., Bethesda, v. 274, p. 35969-35974, 1999.

DENG, W. L.; HUANG, H. C. **Cellular location of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrcC and HrcJ proteins, required for harpin secretion via the type III pathway.** J. Bacteriol., Washington, v. 181, p. 2298-2301, 1999.

DE WEERT, S. et al. **Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*.** Mol. Plant Microbe Interact., Saint Paul, v. 15, p. 1173-1180, 2002.

EBEL, F. et al. **Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages.** Mol. Microbiol., Salem, v. 30, p. 147-161, 1998.

FOUTS, D. E.; et al. **Genome-wide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 99, p. 2275-2280, 2001.

FRANCIS, M. S.; WOLF-WATZ, H.; FORSBERG, A. **Regulation of type III secretion systems.** Curr. Opin. Microbiol., Oxford, v. 5, p. 166-172, 2002.

FREIBERG, C. et al. **Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes.** Nature, v. 387, p. 394–401, 1997.

FU, H.; BURRIS, R. H. **Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*.** J. Bacteriol., Washington, v. 171, p. 3168-3175, 1989.

FURUTANI, A. et al. **Evidence for HrpXo-dependent expression of type III secretory proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.** J. Bacteriol., Washington, v. 186, p. 1374-1380, 2003.

GALÁN, J. E.; COLLMER, A. **Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells.** Science, Washington, v. 284, p. 1322-1328, 1999.

GENIN, S. et al. **Control of the *Ralstonia solanacearum* Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA.** FEBS Lett., Amsterdam, v. 579: 2077-2081, 2005.

GENIN, S.; BOUCHER, C. A. **A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain.** Mol. Gen. Genet., New York, Apr; v. 243(1), p. 112-118, 1994.

GRIMM, C.; PANOPOULOS, N. J. **The predicted protein product of a pathogenicity locus from *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* is homologous to a highly conserved domain of several prokaryotic regulatory proteins.** J. Bacteriol., Washington, v. 171, p. 5031-5038, 1989.

GRIMM, C.; AUFSATZ, W.; PANOPOULOS, N. J. **The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit.** Mol. Microbiol., Salem, v. 15, p. 155-165, 1995.

HACKER, J. et al. **Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysin occur *in vivo* and *in vitro* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates.** Microb. Pathogen, London, v. 8, p. 213-225, 1990.

HACKER, J. et al. **Pathogenic islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution.** Mol. Microbiol., Salem, v. 23, p. 1089-1097, 1997.

HACKER, J.; KAPER, J. B. **Pathogenic islands and the evolution of microbes.** Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto, v. 54, p. 641-679.

HAM, J. H. et al. **A cloned *Erwinia chrysanthemi* Hrp (type III protein secretion) system functions in *Escherichia coli* to deliver *Pseudomonas syringae* Avr signals to plant cells and to secrete Avr proteins in culture.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 95, p. 10206-10211, 1998.

HE, S. Y.; NOMURA, K.; WHITTAM, T. S. **Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens.** Biochim. Biophys. Acta., v. 1694, p. 181-206, 2004.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. **The great escape: structure and function of the autotransporter proteins.** Trends Microbiol., Cambridge, v. 6, p. 370-378, 1998.

HENDRICKSON, E. L.; GUEVERA, P.; AUSUBEL, F. M. **The alternative sigma factor RpoN is required for the *hrp* activity in *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* and acts at the level of *hrpL* transcription.** J. Bacteriol., Washington, v. 182, p. 3508-3516, 2000.

HENIKOFF, S. **Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing.** Gene, Amsterdam, v. 28, p. 351-359, 1984.

HOU, Y. M. **Transfer RNAs and pathogenicity islands.** Trends Biochem. Sci., v. 24, p. 295-298, 1999.

HUANG, H. C. et al. **The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpin_{PSS} secretion that are arranged collinearly with Yersinia *ycs* homologs.** Mol. Plant-Microbe Interact., Saint Paul, v. 8, p. 733-746, 1995.

HUECK, C. J. **Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants.** Microbiol. Mol. Biol. Rev., New York, v. 62, p. 379-433, 1998.

HUYNH, T. V.; DAHLBECK, D.; STASKAVICZ, B. J. **Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity.** Science, Washington, v. 245, p. 1374-1377, 1989.

INNES, R. W. et al. **Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes.** J. Bacteriol., Washington, v. 175, p. 4859-4869, 1993.

KIM, J.; REES, D. C. **Nitrogenase and nitrogen fixation.** Biochemistry, New York, v. 33, p. 389-397, 1994.

KIM, J. F.; WEI, Z. M.; BEER, S. V. ***hrpA* and *hrpC* operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes harpin.** J. Bacteriol., Washington, v. 179, p. 1690-1697, 1997.

KIM, J. G. et al. **Characterization of the *Xanthomonas axonodopis* pv *glycines* Hrp pathogenicity island.** J. Bacteriol., Washington, v. 185, p. 3155-3166, 2003.

KLASSEN, G. et al. **Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*.** Can. J. Microbiol., Ottawa, v. 43, p. 887-891, 1997.

KNOOP, V.; STASKAWICZ, B.; BONAS, U. **Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under control of *hrp* genes and is independent of plant factors.** J. Bacteriol., Washington, v. 173, p. 7142-7150, 1991.

KOBAYASHI, H. et al. **Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod*-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234.** Mol. Microbiol., Salem, v. 51, p. 335-347, 2004.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. **DNA amplification by the polymerase chain reaction.** In Brown, T. A., Essential Molecular Biology : A Practical Approach, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.

KOKOTEC, W.; LOTZ, W. **Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe.** Gene, Amsterdam, v. 84, p. 467-471, 1989.

KRAUSE, A.; DOERFEL, A.; GOTTFERT, M. **Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*.** Mol. Plant-Microbe Interact., Saint Paul, v. 15, p. 1228–1235, 2002

LETUNIC, I. et al. **SMART 5: domains in the context of genomes and networks.** Nucleic Acids Res., Oxford, v. 34, p. D257-D260, 2006.

LI, C. M. et al. **The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ.** EMBO J., Oxford, v. 21, p. 1909-1915, 2002.

LINDGREN, P. B.; PEET, R. C.; PANOPOULOS, N. J. H. **Gene cluster of *pseudomonas syringae* pv. “*phaseolicola*” controls pathogenicity on bean plants and hypersensitive response in nonhost plants.** J. Bacteriol., Washington, v. 168, p. 512-522, 1986.

LINDGREN, P. B. **The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions.** Annu. Rev. Phytopathol., Palo Alto, v. 35, p. 129-152, 1997.

LOWE, T. M.; EDDY, S. R. **tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence.** Nucleic Acids Res., Oxford, v. 25, p. 955-964, 1997.

MALHOTRA, A.; SEVERINOVA, E.; DARST, S.A. **Crystal structure of a sigma 70 subunit fragment from *E. coli* RNA polymerase.** Cell. 1996 Oct 4;87(1):127-36.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 545p, 1982.

MARIE, C. et al. **TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234, is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides.** Mol. Plant Microbe Interact., Saint Paul, v. 17, p. 958–966, 2004.

MARTINEZ-HACKERT, E.; STOCK, A.M. **The DNA-binding domain of OmpR: crystal structures of a winged helix transcription factor.** Structure, Philadelphia, v. 5(1): p. 109-24, 1997.

MEAD, D. A.; SZCZESNA-SKORUPA, E; KEMPER, B. **Single-strand DNA “blue” T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering.** Protein Eng., Eynsham, v. 1, p. 67-74, 1986.

MESSING, M. J. et al. **Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle:** Insertion of a *HindIII* fragment of the *lac* regulatory region in M13 replicative form "in vitro". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Washington, v. 74, p. 3642-3646, 1977.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics.** New York. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y, p. 325-335, 1990.

MILLER, J. F.; MEKALANOS, J. J.; FALKOW, S. **Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence.** Science, Washington, v. 243, p. 916-922, 1989.

MUDGETT, M. B.; STASKAWICZ, B. J. **Protein signaling via type III secretion pathways in phytopathogenic bacteria.** Curr. Opin. Microbiol., Oxford, v. 1, p. 109-114, 1998.

PARSOT, C.; HAMIAUX, C.; PAGE, A. L. **The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems.** Curr. Opin. Microbiol., Oxford, v. 6, p. 7-14, 2003.

PEDROSA, F.; YATES, G. **Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products.** FEMS Microbiol. Lett., Amsterdam, v. 23, p. 95-101, 1984

PRESTON, G. M.; BERTRAND, N.; RAINEY, P. B. **Type III secretion in plants growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25.** Mol. Microbiol., Salem, v. 41, p. 999-1014, 2001.

PUGSLEY, A. P. **The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria.** Microbiol. Rev., Washington, v. 57, p. 50-108, 1993.

PÜHLER, A. *et al.* **What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions?** Curr. Opin. Plant Biol., v. 7, p. 137-147, 2004.

RAHME, L. G.; MINDRINOS, M. N.; PANOPOULOS, N. J. **Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.** J. Bacteriol., Washington, v. 174, p. 3499-3507, 1992.

RUTHERFORD, K. et al. **Artemis: sequence visualization and annotation.** Bioinformatics, v. 16, p. 944-946, 2000.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-termination inhibitors.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANDKVIST, M. **Type II secretion and pathogenesis.** Infect. Immun., Washington, v. 69, p. 3523-3535, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHULTE, R.; BONAS, U. **Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitive on pepper and tomato, is plant inducible.** J. Bacteriol., Washington, v. 174, p. 815-823, 1992.

SCHULTZ, J. et al. **SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 95: 5857–5864, 1998.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. **A broad-host-range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria.** Biotechnology, Frankfurt, v. 1, p. 784-791, 1983.

SLATER, H. et al. **A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*.** Mol. Microbiol., Salem, v. 38, 986-1003, 2000.

SOUZA, E. M. **Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 264 p., 1990.

SOUZA, E. M.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. **Deletions analysis of the promoter region of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae*.** In: Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. TIKHONOVICH, I. A.; NIKOLAI, A. P.; VASSILY, I. R.; WILLIAM, E. N. eds. X International Congress in Nitrogen Fixation. St. Petersburg, p.260, 1995

SPAINK, H. P. et al. **Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI.** Plant Mol. Biol., Dordrecht, v. 9, p. 27-39, 1987.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. **Two-component signal transduction.** Annu. Rev. Biochem, Palo Alto, 2000. v. 69: 183-215

TARTOF, K. D.; HOBBS, C. A. **Improved media for growing plasmid and cosmid clones.** Bethesda Res. Lab. Focus, v. 9, p. 12, 1987.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. **Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane.** Curr. Opin. Cell Biol., London, v. 12, p. 420-430, 2000.

TSUGE, S. et al. **Expression of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *hrp* genes in XOM2, a novel synthetic medium.** J. Gen. Plant Pathol., v. 88, p. 363-371, 2002.

VENKATESAN, M. M.; BUYSSE, J. M.; OAKS, E. V. **Surface presentation of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens requires the products of the *spa* locus.** J Bacteriol., Washington, Mar; v. 174(6), p. 1990-2001, 1992.

VIPREY, V. et al. **Symbiotic implications of Type III protein secretion machinery in *Rhizobium*.** Mol. Microbiol., Salem, v. 28, p. 1381-1389, 1998.

VIVIAN, A.; GIBBON, M. J. **Avirulence genes in plant pathogenic bacteria: signals or weapons?.** Microbiology, New York, v. 143, p. 693-704, 1997.

WALDOR, M. K.; MEKALANOS, J. J. **Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin.** Science, Washington, v. 272, p. 1910-1914, 1996.

WEI, C. F.; DENG, W. L.; HUANG, H. C. **A chaperone-like HrpG protein acts as supressor of HrpV in regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* type III secretion system.** Mol. Microbiol., Salem, v. 57, p. 520-536, 2005.

WEI, Z. M. et al. **Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*.** Science, Washington, v. 257, p. 85-88, 1992.

WEI, Z. M.; SNEATH, B. J.; BEER, S. V. **Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli.** J. Bacteriol., Washington, v. 174, p. 1875-1882, 1992.

WENGELNIK, K. et al. **Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction.** J. Bacteriol., Washington, v. 178, p. 1061-1069, 1996.

WENGELNIK, K.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; BONAS, U. **HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators.** Mol. Plant Microbe Interact., Saint Paul, v. 9, p. 704-712, 1996.

WOODLEY, P.; BUCK, M.; KENNEDY, C. **Identification of sequences important for recognition of *vnf* genes by the VnfA transcriptional activator in *Azotobacter vinelandii*.** FEMS Microbiol. Lett., Amsterdam, v. 135, p. 213-221, 1996.

YOUNG, J. P. W. **Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms.** In: STALEY, G.; BURRIS, R. M.; EVANS, H. J. Biological Nitrogen Fixation, New York: Londres, 1992. 943 p.

XIAO, Y.; LU, Y.; HEU, S.; HUTCHESON, S. W. **Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* cluster.** J. Bacteriol., Washington, v. 174, p. 1734-1741, 1992.

XIAO, Y.; HUTCHESON, S. W. **A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*.** J. Bacteriol., Washington, v. 176, p. 3089-3091, 1994.